

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 novembre 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/092628 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 14/445

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/01637

(22) Date de dépôt international : 15 mai 2002 (15.05.2002)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

2,345,206 16 mai 2001 (16.05.2001) CA
2,346,968 23 mai 2001 (23.05.2001) CA

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr. Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : DRUILHE, Pierre [FR/FR]; 26, rue Lecourbe, F-75015 Paris (FR). GRÜNER, Anne-Charlotte [DK/FR]; 142 rue Marcadet, F-75018 Paris (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(74) Mandataire : ERNEST GUTMANN-YVES PLASSER-AUD S.A.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).

WO 02/092628 A2

(54) Title: PLASMODIUM FALCIPARUM ANTIGENS AND VACCINE AND DIAGNOSTIC USES THEREOF

(54) Titre : ANTIGENES DE PLASMODIUM FALCIPARUM ET LEURS APPLICATIONS VACCINALES ET DIAGNOSTIQUES

(57) Abstract: The invention concerns novel *Plasmodium falciparum* antigens and their vaccine and diagnostic applications. More particularly, the invention concerns immunogenic polynucleotide and polypeptide molecules, compositions comprising them, and methods for diagnosis and vaccination of malaria.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à de nouveaux antigènes de *Plasmodium falciparum* et à leurs applications vaccinales et diagnostiques. Plus particulièrement, la présente invention vise des molécules polynucléotidiques et polypeptidiques immunogéniques, des compositions les comprenant, et des méthodes de diagnostic et de vaccination du paludisme (malaria).

ANTIGÈNES DE PLASMODIUM FALCIPARUM ET LEURS APPLICATIONS VACCINALES ET DIAGNOSTIQUES

CONTEXTE DE L'INVENTION

5 a) Domaine de l'invention

La présente invention se rapporte à de nouveaux antigènes de *Plasmodium falciparum* et à leurs applications vaccinales et diagnostiques. Plus particulièrement, la présente invention vise des molécules polynucléotidiques et polypeptidiques immunogéniques, des compositions les comprenant, et des
10 méthodes de diagnostic et de vaccination du paludisme.

b) Brève description de l'art antérieur

Le paludisme est une maladie provoquée par l'infection de parasites protozoaires appartenant aux apicomplexes de l'espèce *Plasmodium* et transmis
15 par les femelles des moustiques du genre *Anopheles*. Malgré le fait que l'OMS a classé, depuis 1998, le paludisme parmi les trois maladies infectieuses d'intérêt majeur pour la santé publique mondiale au même rang que la tuberculose et le SIDA, il n'existe pas encore de vaccin efficace contre cette maladie.

Des études précédentes ont conduit à la mise en évidence de polypeptides
20 antigéniques du stade pré-érythrocytaire de la maladie, notamment les polypeptides SALSA (pour Sporozoïte Liver Stage Antigen) décrits dans EP A-0407230, le LSA 1 (pour Liver Stage Antigen) décrit dans WO 92/13884 et LSA-3 décrit dans FR 2,735,478.

La présente invention est relative à de nouvelles molécules
25 polynucléotidiques et polypeptidiques spécifiques des stades pré-érythrocytaires et à leurs utilisations à titre de principe actif de vaccin anti-palustre ou dans des méthodes de diagnostics de la maladie.

RÉSUMÉ DE L'INVENTION

30 La Demanderesse a identifié une série de 120 fragments d'ADN génomique codant pour des protéines exprimées aux stades pré-érythrocytaires, c'est-à-dire au stade sporozoïte et/ou au stade hépatique. La caractérisation

initiale de cette série de clones a conduit à identifier l'antigène LSA-1, puis SALSA, puis STARP, puis LSA-3. Des travaux plus récents portant sur 10 fragments de la même banque de clones codant pour des stades pré-érythrocytaires a permis de fournir des précisions concernant 8 d'entre eux, 3 se
5 sont avérés être des gènes déjà connus comme étant exprimés au stade érythrocytaire et les 5 autres comme des gènes nouveaux non décrits à ce jour, et dont l'expression aux stades pré-érythrocytaires a pu être confirmée.

Par ailleurs, les travaux réalisés en utilisant les cellules de volontaires protégés par sporozoïtes irradiés, celles de chimpanzés protégés par la même
10 méthode et celles de chimpanzés comme d'*Aotus trivirgatus*, protégés par immunisation par l'antigène LSA-3 ont conduit à caractériser les réponses cellulaires à fort taux de sécrétion d'interféron- γ , généralement associés avec une faible production d'anticorps, comme étant associées avec l'état de protection, et vice-versa.

15 Parmi les nouveaux gènes pré-érythrocytaires étudiés, deux d'entre eux, dénommés DG747 et DG772 possèdent plusieurs propriétés remarquables: ils génèrent des réponses cellulaires à taux élevé d'Interféron- γ , détectées par ELISPOT chez des volontaires protégés par sporozoïtes irradiés, qui sont retrouvés également pour plusieurs régions de l'antigène LSA-3 mais qui sont
20 absentes pour 4 régions de l'antigène LSA-1, deux de SALSA, deux de STARP et deux de la "CircumSporozoïte protein". Ces deux mêmes clones sont positifs également dans les mêmes tests chez les chimpanzés protégés par des sporozoïtes irradiés. Le profil de réponse différentielle entre les chimpanzés protégés et celles de chimpanzés ayant reçu des sporozoïtes irradiés à trop forte
25 dose, et non protégés, est identique à celui enregistré avec la molécule LSA-3 qui est capable d'induire une protection. Ce profil de réponse correspond, d'après les travaux réalisés chez le rongeur, à la capacité d'induire un recrutement cellulaire spécifique au niveau intra-hépatique. La séquence complète des deux gènes a été identifiée. Les protéines correspondantes ont une antigénicité élevée
30 chez les individus exposés au parasite en zone d'endémie (réaction chez 80% des adultes de zone d'endémie). Leur localisation en surface du sporozoïte et leur production au cours de la maturation intra-hépatique du parasite a été

confirmée par diverses méthodes biologiques. Leur immunogénicité chez l'animal sous forme de protéines recombinantes, ou sous forme de plasmides (immunisation génétique) a été démontrée.

Plus particulièrement, un des aspects de la présente invention concerne
5 un polynucléotide isolé ou purifié comprenant une séquence nucléotidique ayant au moins 60%, préférablement au moins 80% et plus préférablement au moins 95% d'identité avec la SEQ ID NO: 1 (DG747) ou la SEQ ID NO: 2 (DG772).

Un autre aspect de la présente invention concerne un polynucléotide isolé ou purifié comprenant au moins 10 nucléotides consécutifs identiques à la SEQ
10 ID NO: 1 ou la SEQ ID NO: 2. L'invention vise également les polynucléotides isolés ou purifiés qui s'hybrident dans des conditions de fortes stringences avec un polynucléotide tel que défini précédemment.

Un autre des aspects de la présente invention concerne un polypeptide isolé ou purifié qui est codé par un polynucléotide tel que défini précédemment.
15 Dans un mode de réalisation privilégié, le polypeptide de l'invention présente au moins 60%, préférablement au moins 80% et plus préférablement au moins 95% d'homologie avec la SEQ ID NO: 3 (DG747) ou la SEQ ID NO: 4 (DG772). Selon un autre mode de réalisation privilégié, le polypeptide de l'invention comprend au moins 5 acides aminés consécutifs identiques à l'une des SEQ ID NOs: 3 à 8.
20 Encore dans un autre mode de réalisation privilégié, le polypeptide de l'invention présente au moins 40%, préférablement au moins 60%, plus préférablement au moins 80% et encore plus préférablement au moins 95% d'identité avec l'une des SEQ ID NOs: 3 à 8, 10 et 12. L'invention couvre également les polypeptides recombinants ou chimériques comprenant au moins un polypeptide tel que défini
25 précédemment.

Un autre des aspects de la présente invention concerne un antigène isolé ou purifié consistant en un polynucléotide ou en un polypeptide tels que définis précédemment.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un conjugué
30 antigénique constitué d'un polynucléotide et/ou d'un polypeptide tels que définis précédemment; et d'un support sur lequel lesdits polynucléotides/polypeptides sont adsorbés. Un tel conjugué peut avantageusement être utilisé pour

l'immunisation d'individus infectés ou susceptibles d'être infectés par le paludisme.

Un autre des aspects de la présente invention concerne des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, préférablement humanisés, reconnaissants spécifiquement au moins un des polynucléotides, polypeptides et/ou conjugués définis précédemment. Un aspect connexe de la présente invention concerne les compositions pharmaceutiques qui comprennent à titre de substance active un ou plusieurs de ces anticorps polyclonaux ou monoclonaux, en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un vecteur de clonage ou d'expression (tel que les plasmides, les cosmides et les phages) comprenant une séquence polynucléotidique selon la présente invention. L'invention couvre également les cellules hôtes comprenant un tel vecteur, et tout particulièrement les cellules *E.Coli* recombinantes déposées à la C.N.C.M. le 23 Mai 2001 sous les numéros d'accèsion I-2671 et I-2672.

Un autre des aspects de la présente invention concerne une composition immunogène comprenant des polynucléotides, des polypeptides et/ou des conjugués tels définis précédemment; et un véhicule pharmaceutique acceptable.

Un autre aspect connexe de la présente invention concerne un vaccin anti-palustre comprenant des polynucléotides, des polypeptides et/ou des conjugués tels définis précédemment; et un véhicule pharmaceutique acceptable. Préférablement, les compositions et vaccins de la présente invention sont utilisées pour la fabrication de médicaments destinés à la prévention et/ou au traitement du paludisme.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne des méthodes et des kits (trousses) de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum*. Selon un mode de réalisation privilégié, la méthode comprend les étapes suivantes:

a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu et/ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec un

5

anticorps tels que définis précédemment afin de permettre la formation de complexes immuns; et

b) la détection *in vitro* des complexes immuns formés.

Selon un autre mode de réalisation privilégié, la méthode de diagnostic

5 comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu et/ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec des polynucléotides, des polypeptides, et/ou des tels que définis précédemment, afin de permettre la formation de complexes immuns impliquant au moins un desdits éléments et des anticorps éventuellement présents dans ledit tissu ou ledit fluide biologique; et

10

b) la détection *in vitro* des complexes immuns éventuellement formés.

Selon un mode de réalisation privilégié, le kit de l'invention pour le diagnostic *in vitro* du paludisme comprend les éléments suivants:

15

a) au moins un des éléments choisi dans le groupe constitué par: les polynucléotides, les polypeptides, et les conjugués tels que définis précédemment;

b) des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins une des éléments définis en (a); et

20

c) des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué.

25

Selon un autre mode de réalisation privilégié, le kit de l'invention comprend les éléments suivants :

- des anticorps tels que définis précédemment;
- des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins un desdits anticorps; et
- des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également

30

porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué.

Un des avantages majeur de la présente invention est qu'elle fournit de nouvelles molécules polynucléotidiques et polypeptidiques spécifiques des stades pré-érythrocytaires du paludisme. Les molécules polynucléotidiques et polypeptidiques de l'invention possèdent plusieurs propriétés remarquables. Ils génèrent notamment des réponses cellulaires à taux élevé d'interféron- γ . Les résultats obtenus suggèrent également que les molécules polynucléotidiques et polypeptidiques de l'invention ont la capacité d'induire un recrutement cellulaire spécifique au niveau intra-hépatique. L'invention fournit également des vaccins anti-palustre efficaces et des méthodes de diagnostics sensibles du paludisme.

De nombreux autres objectifs et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la description non limitative de l'invention qui suit.

15

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

Les Figures 1A, 1B, 1C et 1D montrent la liste des séquences nucléotidiques (SEQ ID NOs: 1 et 2) et en acides aminés (SEQ ID NOs: 3 et 4) de DG747 et DG772.

La Figure 1E montre des séquences répétées dégénérées caractéristiques du clone DG747 (SEQ ID NOs: 5-8).

La Figure 2A montre la séquence du gène codant pour DG747 (SEQ ID NOs: 9 et 10) extrait de la base des données génome de clone 3D7 de *Plasmodium falciparum* (Gène PfB00155). En gris, la séquence correspondant au clone DG747. La différence avec la séquence issue de la souche T9.96 (positions 344, 357) est montrée en gras dans la séquence.

La Figure 2B montre la séquence du gène codant pour DG772 (SEQ ID NOs: 9 et 10) extrait de la base des données génome de clone 3D7 de *Plasmodium falciparum*. En gris, la séquence correspondant au clone DG772. La différence avec la séquence issue de la souche T9.96 (position 3612) est montrée en gras dans la séquence.

Les Figures 3.1(a) et 3.1(b) sont des représentations schématiques des protéines correspondantes au DG747 (a) et DG772 (b). Les flèches pleines

indiquent la localisation des amorces utilisées pour l'étude de la conservation des fragments. Les flèches vides indiquent les amorces utilisées dans la réaction RT-PCR. 3.1(a): la partie hachurée indique la région répétitive. 3.1(b): les deux régions consensus 5' cys et 3' cys sont indiquées sur le gène. La partie en pointillés représente les régions transmembranaires et non-transcrites supposées.

Les Figures 3.2A, 3.2B, 3.2C et 3.2D montrent des IFATs des stades sporozoïtes et sanguins de *P. falciparum* et des sporozoïtes de *P. yoelii* avec les anticorps anti-DG747 ou anti-DG772. Fig. 3.2A, Fig. 3.2B: sporozoïte de *P. falciparum* (A) ou *P. yoelii* (B) marqué au anti-747 ou anti-772; Fig. 3.2C, Fig. 3.2D: stade sanguin asynchrone marqué au anti-747 (C) ou au anti-772 (D); a, t, s: formes anneaux, trophozoïtes ou schizontes, respectivement.

Les Figures 3.3(a) et 3.3(b) montrent des Western blots de *P. falciparum*, *P. yoelii* et de *P. berghei* utilisant des anticorps anti-His₆-747 (a) et anti-His₆-772 (b). Ligne 1: *P. falciparum* sporozoïtes; Ligne 2: *P. falciparum* stade sanguin formes anneaux; Ligne 3: *P. falciparum* stade sanguin formes schizontes; Ligne 4: surnageant de culture asynchrone; Ligne 5: Globules rouges humains; Ligne 6: *P. yoelii* sporozoïtes; Ligne 7: *P. yoelii* stade sanguin; Ligne 8: *P. berghei* stade sanguin; 9: Globules rouges de souris.

Les Figures 3.4(a), 3.4(b) et 3.4(c) montrent sous forme de photographies des résultats de PCR d'ADN de 12 souches différentes avec des amorces spécifiques de DG747 3.4(a) et DG772 3.4(b). Le contrôle, 3.4(c), est un gène constitutif, le PCNA [Kilbey, 1993 #519]. Les ADN utilisés sont issus des souches : NF54, B1, F32, D7, D25, D28, D41, D50, D51, H1, L1, Mad20, T9.96, PA (puits 1 à 14, de gauche à droite). Le puits 15 ne contient pas d'ADN. La taille du produit PCR, correspondant à celle attendue est indiquée à côté des flèches.

Les Figures 3.5(a) et 3.5(b) illustrent à l'aide de graphiques la prévalence des réponses humores contre His₆-747 (a) et His₆-772 (b) dans deux groupes d'âge et dans deux zones d'endémie différente.

Les Figures 3.6(a) et 3.6(b) illustrent à l'aide de graphiques les réponses cellulaires contre His₆-747 et His₆-772 chez des humains et des chimpanzés immunisés avec des sporozoïtes irradiés. Fig. 3.6a: Détection par Elispot de la

sécrétion d'IFN- γ de cellules provenant d'humains immunisés par des sporozoïtes irradiés; Fig. 3.6b: réponses cellulaires des chimpanzés immunisés par des sporozoïtes irradiés, détectés par stimulation de prolifération de lymphocytes T et sécrétion d'IFN- γ (par dosage et Elispots). I.S.: Index de stimulation; UI: Unités Internationales; LC: Leucocytes (cellules mononuclées du sang périphérique). His₆-729, PC-pGEX: Recombinants appartenant à la protéine LSA3; pGEX: protéine GST. Les valeurs seuils sont indiquées par une droite horizontale sur le graphe.

Les Figures 3.7(a) et 3.7(b) illustrent à l'aide de graphiques la distribution des isotypes d'IgG dans les réponses humorales contre His₆-747 et His₆-772 d'individus exposés différenciellement au paludisme. ISS: Volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés; SHI: Sérum hyper-immun; Transfusion: Sérum de personnes ayant contracté un paludisme par transfusion de sang infecté. Les taux de réponses détectés en ELISA sont représentés par rapport aux taux d'IgG total obtenus. L'écart type est indiqué sur le graphique.

Les Figures 3.8(a) et 3.8(b) illustre à l'aide de graphiques les réponses humorales de souris immunisées avec quatre formulations de protéines recombinantes. Fig. 3.8a: réponses anti-747; Fig. 3.8b: réponses anti-772; SB: avec l'adjuvant SBS2A; micro: recombinant adsorbé sur des microparticules; IFA: Adjuvant incomplet de Freund; Vi: Sous forme d'ADN dans le vecteur VR1020 en PBS.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

L'originalité de la présente invention porte sur la mise en évidence de nouvelles molécules polynucléotidiques et polypeptidiques spécifiques du stade pré-érythrocytaire du paludisme et à leurs utilisations à titre de principe actif de vaccin anti-palustre ou dans des méthodes de diagnostic de la maladie.

Plus particulièrement, l'invention vise des polynucléotides ayant une séquence nucléotidique d'au moins 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, ou 200 nucléotides consécutifs et ayant au moins 60%, 65%, 70%, 75% préférablement 80%, 85%, 90% et plus préférablement au moins 95%, 97% ou même 100% d'identité avec la SEQ. ID NO: 1 ou NO 2. D'autres molécules selon l'invention

s'hybride dans des conditions de fortes stringences avec les séquences nucléotidiques ci-dessus, et plus particulièrement avec les SEQ. ID NOs: 1 et/ou NO 2. À titre d'exemple non-limitatif de conditions de fortes stringences l'on retrouve la méthode suivante:

- 5 a) pré-hybridation et hybridation à 68°C dans une solution contenant: 5X SSPE (1X SSPE = 0.18 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄); 5X solution de Denhardt; 0.05% (w/v) dodecyl sulfate de sodium (SDS); et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon;
 - 10 b) deux lavages à température ambiante pendant 10 min en présence de 2X SSPE et de 0.1% SDS;
 - c) un lavage à 60°C pendant 15 min en présence de 1X SSPE et 0.1% SDS; et
 - d) un lavage à 60°C pendant 15 min en présence de 0.1X SSPE et 0.1% SDS.
- 15 L'invention vise aussi les polypeptides (et les fragments de ceux-ci) qui dérivent des séquences nucléotidiques ci-dessus mentionnés et préférablement les polypeptides ayant au moins 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, ou 200 acides aminés consécutifs et au moins 60%, 70%, 80%, 85% et plus préférablement au moins 90%, 95%, 97% ou même 100% d'homologie avec l'une des séquences
- 20 choisies dans le groupe constitué par les SEQ ID NOs: 3 à 8, 10 et 12. D'autres molécules selon l'invention contiennent au moins 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, ou même 200 acides aminés consécutifs présentant au moins 60%, 70%, 80%, 85% et plus préférablement au moins 90%, 95%, 97% ou même 100% d'identité avec les SEQ ID NOs: 3 à 8, 10 et 12.
- 25 Il est bien connu dans le domaine comment déterminer les pourcentages d'homologie et d'identité entre différentes séquences. À titre d'exemple, une méthode d'analyse d'alignement de séquences nucléotidiques et peptidiques selon l'invention est avantageusement le programme GAP GCG™ (Genetic Computer Group) du manuel de programmation UNIX™ (Wisconsin Sequence
- 30 Analysis Package™), algorithme de Needleman et Wunsch. Les paramètres utilisés sont les paramètres par défaut ou les paramètres suivants: pour une comparaison de séquences de nucléotides: "gap penalty" = 50; "gap extension

penalty": 3; et pour une comparaison de séquences d'acides aminés: "gap penalty" = 5; "gap extension penalty": 0.30.

Les peptides selon la présente invention peuvent être préparés par tout procédé approprié. Ils peuvent notamment être obtenus par synthèse chimique
5 mais il est également possible de les obtenir par voie biologique en utilisant notamment différents vecteurs dans les cultures cellulaires appropriées tel que cela sera décrit ci-après.

Les molécules de l'invention peuvent être utilisées telles quelles ou être modifiées (conjugués chimiques, protéine de fusion) si nécessaire. Par exemple,
10 on peut envisager des modifications (chimiques ou nucléotidiques ou peptidiques) permettant aux nucléotides/peptides de franchir certaines barrières biologiques, de montrer une meilleure solubilisation, de faciliter leur incorporation dans des formes galéniques particulières comme par exemple des liposomes ou des microparticules. Il convient d'ailleurs de remarquer à ce propos que les
15 peptides selon la présente invention peuvent se présenter sous forme déglycosylée, ou glycosylée, si cela est nécessaire. Une personne versée dans le domaine de l'invention saura obtenir différents polynucléotides/polypeptides et elle saura également déterminer quels sont, parmi les polynucléotides/polypeptides obtenus, ceux qui ont une activité biologique
20 adéquate.

Ainsi, l'invention a aussi pour objet un procédé de préparation d'un peptide de l'invention, par transformation d'un hôte cellulaire à l'aide d'un vecteur d'expression (plasmide, cosmide, virus, etc) comprenant les séquences d'ADN codant pour les peptides de l'invention, suivi de la mise en culture de l'hôte
25 cellulaire ainsi transformé, et de la récupération du peptide dans le milieu de culture.

L'invention concerne donc également tout vecteur (de clonage et/ou d'expression) et tout hôte cellulaire (procaryote ou eucaryote) transformé par un tel vecteur, et comprenant les éléments de régulation permettant l'expression de
30 la séquence de nucléotides codant pour un peptide selon l'invention.

Plus particulièrement, l'invention vise les cellules *E. Coli* recombinante contenant un insert correspondant aux polynucléotides définis par les SEQ ID

NOs: 1 et 2. Plus préférablement les cellules *E. Coli* sont celles qui ont été déposée à la C.N.C.M. le 23 Mai 2001 sous les numéros d'accension I-2671 et I-2672. Brièvement, ces cellules ont été obtenues par transformation d'un plasmide contenant soit un insert correspondant aux polynucléotides définis par la SEQ ID NO: 1, soit un insert correspondant aux polynucléotides définis par la SEQ ID NO:2. dans la souche *E. Coli* Dh5 α . Chacun des plasmides a été obtenus à partir d'un phage λ gt11 recombinant contenant l'insert. Une PCR a été effectuée avec des amorces flanquantes à l'insert et cet insert amplifié a été digéré avec EcoR1 et sous-cloné dans le vecteur pTreHis₆ (Invitrogen) dans les sites de EcoR1.

L'utilisation de vecteurs pour l'expression de protéines et de peptides dans les cellules d'un hôte, notamment l'humain, est connue et ne sera pas décrite plus en détail. Il peut être avantageux d'utiliser des vecteurs incorporant des séquences capables d'augmenter l'immunogénicité des polynucléotides/polypeptides de la présente invention, telles que les séquences CPG, le gène du GMCSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) ou des gènes des cytokines. Les constructions spécifiques dépendent évidemment de l'hôte, de l'épitope et du vecteur retenu.

Les peptides de la présente invention et les polynucléotides les codant peuvent aussi être utilisés pour préparer des anticorps polyclonal ou monoclonal capables de se fixer (préférablement de manière spécifique) sur au moins un peptide/polynucléotide objet de l'invention. La présente invention vise donc également de tels anticorps purifiés qui peuvent être obtenus par des techniques très bien connues comme par exemple la technique décrite par Kolher et Milstein (Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* (1975), 262:495-497).

Dans un mode de réalisation privilégié de l'invention, au moins une portion des peptides immunogéniques/polynucléotides selon l'invention est conjuguée à un support sur lequel elle est absorbée ou fixée de façon covalente ou non-covalente à son extrémité C et/ou N-terminale. Le support peut être constitué de molécules porteuses (naturelles ou synthétiques), physiologiquement acceptables et non toxiques. Ces molécules porteuses peuvent permettre

notamment d'augmenter l'immunogénicité des peptides de l'invention par l'intermédiaire de groupements réactifs complémentaires respectivement portés par la molécule porteuse et le peptide. À titre d'exemple de molécules porteuses, on mentionnera des protéines naturelles telles que l'anatoxine tétanique, l'ovalbumine, des sérums albumines, des hémocytamines, le PPD (purified protein derivative) de la tuberculine, etc. À titre de supports macromoléculaires synthétiques, on mentionnera par exemple des polylysines ou des poly(D-L-alanine)-poly(L-lysine). À titre de supports hydrocarbonés ou lipidiques, on mentionnera les acides gras saturés ou insaturés. Le support peut également prendre la forme de liposomes, de particules et microparticules, de vésicules, de microsphères de billes de latex, de polyphosphoglycans (PGLA), ou de polystyrène.

L'invention porte aussi sur des compositions vaccinales/thérapeutiques (médicament) comprenant des peptides/polynucléotides, des conjugués et/ou des anticorps polyclonaux ou monoclonaux tel que décrits précédemment, et un véhicule pharmaceutique acceptable. L'invention se rapporte aussi à des compositions immunogènes capables d'induire une protection par une infection d'épreuve par *Plasmodiums*, aussi bien *in vivo* que *in vitro* et, de façon préférée, une protection par une infection d'épreuve par *Plasmodium falciparum*. Préférentiellement, les compositions selon l'invention permettent la production d'interféron- γ par des leucocytes de sujets immunisés par des sporozoïtes irradiés et/ou l'obtention d'une réponse humorale IgG de type IgG1, IgG2, IgG3 et/ou IgG4.

Ces compositions peuvent être avantageuses dans le but d'être administrés *in vivo* pour le traitement ou la prévention du paludisme chez l'humain. Bien entendu, l'utilisation de compositions à base d'anticorps nécessite généralement que ceux-ci soient compatibles avec l'administration à l'être humain. Il peut notamment s'agir d'anticorps humanisés par des techniques connues ou directement exprimés *in situ* à partir de la séquence d'ADN comme par exemple la technique décrite dans Ren EC, Cellular and Molecular approaches to developing human monoclonal antibodies as drugs (1991), *Ann. Acad. Med. Singapore*, 20:66-70.

Les compositions selon la présente invention peuvent se présenter sous une forme solide ou liquide quelconque habituelle pour l'administration pharmaceutique, c'est-à-dire par exemple des formes d'administration liquide, en gel, ou tout autre support permettant par exemple la libération contrôlée. Parmi
5 les compositions utilisables, on peut citer notamment les compositions injectables plus particulièrement destinées aux injections dans la circulation sanguine chez l'humain.

Les compositions de l'invention peuvent comporter également des composants augmentant ou susceptible d'augmenter l'immunogénicité des
10 peptides, notamment d'autres peptides immunogènes, des adjuvants d'immunité spécifiques ou non tels que l'alun, le QS21, l'adjuvant de Freund, l'adjuvant SBA₂, la montanide, des polysaccharides ou des composés équivalents.

La présente invention concerne de plus des compositions destinées à être administrées afin d'exprimer *in situ* les peptides décrits précédemment. Par
15 exemple, en injectant l' "ADN nu" codant pour les peptides immunogéniques de l'invention, cette injection conduit, dans un certain nombre de cas, à l'expression du peptide codée et à une réponse immunitaire contre ledit peptide. On pourra également utiliser des systèmes d'ADN nu mais comportant leur propre système d'expression ou des vecteurs d'expression tel que décrit précédemment. Les
20 vecteurs d'expression sont susceptibles, dans certains cas, d'améliorer l'activité des peptides exprimés. Les systèmes de vaccination mettant en œuvre des séquences d'ADN sont connus et sont déjà largement décrits dans la littérature. Des exemples de vaccination mettant en œuvre des séquences d'ADN sont décrits dans la demande internationale WO 95/111307 et dans la publication de
25 Bot *et al.* (DNA immunization of newborn mice with a plasmid expressing nucleoprotein of *Influenza* virus (1996), *Viral Immunol.*, 9:207-210).

L'invention porte aussi sur des méthodes de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum*.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la méthode comprend les
30 étapes suivantes:

- a) mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un

individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec un anticorps tel que décrit précédemment afin de permettre la formation de complexes immuns; et

b) la détection *in vitro* des complexes immuns formés.

5 Selon un mode de réalisation de l'invention, la méthode diagnostique comprend les étapes suivantes:

a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec des
10 molécules polynucléotidiques/polypeptidiques telles que décrites précédemment afin de permettre la formation de complexes immuns impliquant au moins une desdites molécules et des anticorps éventuellement présents dans ledit tissu ou ledit fluide biologique; et

b) la détection *in vitro* des complexes immuns éventuellement formés.

15 L'invention a aussi pour objet des kits (trousses) pour le diagnostic du paludisme chez un individu. Selon un mode de réalisation de l'invention, le kit comprend les éléments suivants:

a) au moins un des éléments choisi dans le groupe constitué par: les molécules polynucléotidiques; les molécules polypeptidiques et les
20 conjugués tels que décrits précédemment;

b) des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins une des molécules définies en (a); et

c) des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps
25 produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le kit comprend les éléments suivants:

30 - des anticorps tels que décrits précédemment;
- des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins un desdits anticorps; et

- des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué

5 Bien qu'à travers le mémoire descriptif de la présente invention on utilise le terme "peptide" et "polypeptide", il est entendu que l'invention ne se limite pas aux composés formés par l'union d'un nombre limité d'acides aminés. En effet, la souplesse des technologies recombinantes permet de réaliser des protéines comportant une pluralité d'épitopes identiques ou différents et susceptibles
10 d'améliorer l'activité immunogénique du produit final. Ainsi la présente invention couvre également les polymères immunogéniques comprenant entre deux et dix peptides choisis parmi les polypeptides définis précédemment. De même, la présente invention inclut les oligonucléotides ayant une séquence nucléotidique codant pour des oligonucléotides incorporant un ou plusieurs polynucléotides tels
15 que définis précédemment.

Les exemples ci-après permettront de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

EXEMPLES

20 Les exemples qui suivent servent à illustrer l'étendue d'utilisation de la présente invention et non à limiter sa portée. Des modifications et variations peuvent y être effectués sans que l'on échappe à l'esprit et à la portée de l'invention. Bien que l'on puissent utiliser d'autres méthodes ou produits équivalents à ceux que l'on retrouve ci-dessous pour tester ou réaliser la
25 présente invention, le matériel et les méthodes préférés sont décrits.

1) INTRODUCTION

1.1 Historique du paludisme

30 Le paludisme est une maladie provoquée par l'infection de parasites protozoaires appartenant aux apicomplexes de l'espèce *Plasmodium* et transmis par les femelles des moustiques du genre *Anopheles*. Les efforts soutenus et le programme d'éradication entamé dans les années 50, financé par l'OMS ont

permis de limiter les zones où la maladie se propageait et de diminuer le nombre de personnes infectées. Depuis, la baisse d'efficacité des moyens de lutte contre le parasite a provoqué une augmentation des cas de paludisme par rapport à il y a 20 ans. Aujourd'hui le paludisme demeure concentré dans la ceinture sub-tropicale où entre 300 et 500 millions de cas cliniques sont recensés annuellement, dont au minimum 3 millions succombent en majorité à cause de l'infection par le *P. falciparum*. Suite à l'apparition et à l'extension d'une résistance globale aux seuls médicaments efficaces, et parce que les régions affectées sont en extension, l'OMS a classé, depuis 1998, le paludisme parmi les trois maladies infectieuses d'intérêt majeur pour la santé publique mondiale au même rang que la tuberculose et le SIDA.

La description de l'infection paludéenne, dont les signes cliniques sont très caractéristiques, peut être retrouvée dans des écrits des civilisations les plus anciennes, tels que le *Nei Ching*, grand répertoire médical pour l'empereur chinois Huang Ti (2700 av. J. C.), des tablettes Mésopotamiennes (2000 av. J. C.), des papyrus Égyptiens (1500 av. J. C.) et des écrits Védiques (1500-800 av. J. C.). Une partie du « livre des épidémies » d'Hippocrate (460-370 av. J. C.) a été consacrée à la description détaillée de fièvres tertiaires ou quaternaires où est mentionnée aussi une relation entre des splénomégalias et la proximité des zones marécageuses. D'ailleurs, le terme paludisme désigne une fièvre issue des zones marécageuses (L. palude = marécage), ce qui est aussi reflété par le terme de malaria (l. mall'aria) probablement introduit par Sansovino en 1560 pour décrire le « mauvais air » issu des marécages. Le drainage de ces zones a été un des seuls moyens de contrôle du paludisme connu avant la découverte de l'agent infectieux. Malgré la connaissance des signes cliniques, le parasite causant la maladie n'a été découvert qu'à la fin du 19^e siècle.

En 1880 Charles Louis Alphonse Laveran a observé l'exflagellation de microgamètes et des hématies altérées dans le sang de (Laveran, 1880), et il a associé ces formes avec la maladie. Ses conclusions ont été controversées et ne furent acceptées par d'autres, en particulier par l'importante école italienne, que 5 ans plus tard. Le mode de transmission de la maladie est resté inconnu encore 12 ans. Patrick Manson avait en 1877 démontré que le nématode de la filariose

(Elephantiasis) était transmis par un moustique. Il était convaincu que le paludisme suivait un parcours semblable. Il a conseillé à Ronald Ross d'entamer des recherches à ce sujet et ce dernier a décrit en 1897, pour la première fois, des oocystes chez des moustiques ayant été nourris sur des humains infectés.

5 Puis, à l'aide de *Plasmodium* d'oiseaux, il a pu décrire le cycle entier du parasite chez le moustique. Ce cycle a été confirmé, en 1898, pour les espèces plasmodiales de l'homme par les chercheurs italiens menés par Battista Grassi.

On a longtemps cru qu'après inoculation par le moustique, le sporozoïte envahissait directement le globule rouge du mammifère hôte, initiant ainsi le

10 cycle sanguin asexué et sexué. Un cycle exo-érythrocytaire fut décrit dès 1908 chez des plasmodies d'oiseaux par H. de Beaufaire Aragao qui démontra le développement de formes atypiques, dans des cellules endothéliales et des macrophages, capables de libérer des formes envahissant les globules rouges et de se transformer en formes typiques pigmentées du parasite. Toutefois on a cru

15 que le cycle tissulaire était une forme particulière de ces espèces plasmodiales. Ce n'est qu'en raison des observations faites au cours d'infections paludéennes induites et suivies étroitement chez des individus (comme la malariothérapie des années 1920-50) que la présence d'un stade supplémentaire tissulaire a été postulée puis activement recherchée. Les formes pré-érythrocytaires des

20 parasites de primates et d'humains n'ont été découvertes qu'en 1948 lorsque H.E. Shortt et P. C. C. Garnham ont décrit des formes hépatiques issues d'inoculations de sporozoïtes de *P. cynomolgi* (proche de *P. vivax*) chez le singe rhésus (Shortt and Garnham, 1948). En 1951, les mêmes stades ont été décrits pour *P. falciparum* (Shortt et al., 1951) dans une expérience remarquable où une

25 biopsie de foie a été prélevé chez un volontaire préalablement inoculé avec des millions de sporozoïtes. Toutefois les recrudescences dues à *P. vivax* ou à *P. ovale* n'étaient pas expliquées, et on a émis l'hypothèse d'un cycle exo-érythrocytaire « secondaire ». Ce n'est que beaucoup plus tard que ce phénomène fut démontré expérimentalement. Ainsi, un stade « dormant » de la

30 forme hépatique, l'hypnozoïte, a été décrit en 1980 (Krotoski et al., 1980) pour *P. cynomolgi*, l'équivalent pour le primate de *P. vivax*. Cette forme est responsable des rechutes après une longue période d'absence de parasite dans le

sang/d'exposition aux parasites, qui sont caractéristiques de *P. vivax* et *P. ovale*. Récemment, un stade supplémentaire, le mérophore, une forme provenant des formes sanguines, a été observé dans la rate et les ganglions lymphatiques de souris infectées par les *Plasmodium* murins (*P. yoelii*, *P. chabaudi* et *P. vinckei*) (Landau et al., 1999). Cette étape du cycle reste encore à être décrite dans les espèces plasmodiales humaines.

Le cycle du parasite, comme il est conçu aujourd'hui est représenté dans la figure 1 (Les parties entre parenthèse sont des formes décrites pour d'autres espèces de *Plasmodium*, mais pas pour *P. falciparum*).

1.2 Les moyens de lutte contre l'extension du paludisme : nécessité du développement d'un vaccin

Les deux découvertes de l'agent causal de la maladie et du vecteur de la maladie ont permis dès le début du 20^e siècle d'élaborer des moyens de défense rationnels contre le paludisme en attaquant le parasite chez l'hôte vertébré par des médicaments ou en ciblant le moustique vecteur soit avec des larvicides, soit avec des insecticides, soit par l'utilisation de moustiquaires. Le succès de l'élimination de la maladie dans les zones tempérées après la 2^{ème} guerre mondiale, a mené vers une mise en place d'un programme d'éradication du paludisme qui a culminé dans les années 60 où le DDT a été le principal outil contre les moustiques et la chloroquine a été la principale drogue contre le parasite. La taille des territoires endémiques ciblés a ainsi été réduite (quasi éradication dans les zones tempérées) et le nombre de personnes affectées par la maladie a initialement diminué. Cependant les succès dans les zones tropicales furent de courte durée. Le nombre de malades n'a pas cessé de croître d'une part à cause de l'augmentation démographique, d'autre part en raison de l'apparition de résistances aux insecticides et aux drogues disponibles.

L'apparition de ces résistances a nécessité de s'orienter vers d'autres moyens de lutte. L'existence d'une immunité naturelle induite par l'exposition aux parasites et l'observation que le transfert passif d'immunoglobulines de personnes immunes diminue la parasitémie ainsi que l'immunisation efficace et stérilisante par des sporozoïtes atténués par irradiation ont rendu raisonnable

l'argument d'un vaccin contre le paludisme, dont le développement constitue alors une priorité de santé publique au niveau mondial.

1.3 A la recherche de l'immunité salvatrice

5 L'immunité naturelle contre le paludisme est caractérisée par un développement très lent et le fait qu'elle n'aboutit pas à une protection stérilisante. Dans les zones hyperendémiques, l'acquisition de l'immunité naturelle contre les stades érythrocytaires se manifeste chez les enfants d'abord par une tolérance au parasite (immunité anti-toxique) puis avec l'âge par une
10 diminution de la charge parasitaire dans le sang (immunité anti-parasitaire).

Ces observations, faites au cours des études épidémiologiques ont été confirmées par des infections expérimentales. La malarariothérapie appliquée aux personnes atteintes de neurosyphilis (Boyd and Coggeshall, 1938; Ciuca et al., 1943; James, 1936), a permis de définir des paramètres qui interviennent
15 dans l'acquisition de l'immunité dans des expériences étroitement contrôlées. Il a ainsi été montré que l'immunité acquise était d'une part dépendante de l'espèce et de la souche et d'autre part différait en fonction du stade du cycle parasitaire infectant. Jusqu'à présent, les mécanismes précis de l'immunité anti-paludéenne restent à élucider.

20 Du fait que les signes cliniques et la transmission sont uniquement dus aux stades sanguins et que ceux-ci sont les plus accessibles aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, la plupart des études vaccinales ont concerné ces stades. Une trentaine d'antigènes exprimés dans les parasites érythrocytaires ont été identifiés, particulièrement par des anticorps monoclonaux et considérés en tant
25 que candidats vaccins. Toutefois les essais d'induction d'immunité protectrice par les rares antigènes testés chez l'homme sont demeurés infructueux jusqu'à présent.

La première immunisation avec les stades pré-érythrocytaires a été tentée sans succès par les frères Sergent en Algérie (Sergent and Sergent, 1910). La
30 capacité de protéger de façon stérilisante (absence de toute parasitémie sanguine) n'a été obtenue que par l'immunisation avec des sporozoïtes atténués par irradiation. Cette approche fut initiée par des études chez l'oiseau avec des

sporozoïtes irradiés par des rayons U.V. (Mulligan et al., 1941), et a été reprise 20 ans plus tard avec des plasmodies de rongeur en utilisant des sporozoïtes irradiés par des rayons X et plus tard des rayons γ , dont la dose peut être contrôlée plus facilement (Nussenzweig et al., 1967; Richards, 1966) ; l'immunité
5 peut être maintenue par un rappel de sporozoïtes non-atténués (Orjih et al., 1982). Chez l'homme, une telle protection a aussi été obtenue (Clyde, 1975; McCarthy and Clyde, 1977), toutefois elle n'est induite qu'après un très grand nombre d'inoculations par des sporozoïtes irradiés si bien qu'une telle procédure vaccinale ne peut être appliquée à grande échelle.

10 Pendant longtemps, on a cru que la protection était corrélée avec un phénomène observé lorsque l'on incube les sporozoïtes avec du sérum immun, la CS (Circum sporozoïte) précipitation (Vanderberg et al., 1969). La protéine majoritaire reconnue par ce sérum, la protéine CS, a donc été considérée responsable de cette immunité. Depuis elle a été à l'origine de multiples études
15 vaccinales dans beaucoup de modèles expérimentaux. Or jusqu'à présent aucune de ces études n'a pu reproduire une immunité aussi solide que celle induite par des sporozoïtes irradiés.

Une évaluation critique des résultats expérimentaux précédents a mené à postuler que c'était le stade hépatique et non le sporozoïte qui était à l'origine de
20 immunité stérilisante (Druilhe and Marchand, 1989). L'indice principal était le fait que la protection ne pouvait être induite que par l'inoculation des sporozoïtes viables, par voie intraveineuse, capables d'envahir un hépatocyte et de s'y développer, et que les formes hépatiques issues de sporozoïtes irradiés persistaient (Ramsey et al., 1982). De plus, une élimination des stades
25 hépatiques provoquait une susceptibilité aux infections par des sporozoïtes chez des animaux préalablement protégés (Londono et al., 1991; Scheller and Azad, 1995).

Le stade hépatique possède des caractéristiques uniques. L'hépatocyte est une cellule nucléée métaboliquement très active et exprime des molécules du
30 complexe majeur d'histocompatibilité. La schizogonie hépatique entraîne la formation d'entre 10.000 et 30.000 mérozoïtes alors que 4 à 32 mérozoïtes sont libérés par un schizonte sanguin. Les mérozoïtes issus de ces deux stades ont

des différences morphologiques, mais on ne sait pas s'il existe des différences fonctionnelles ou moléculaires, car seuls les mérozoïtes sanguins ont pu être extensivement étudiés.

5 Du fait que dans le foie, seuls quelques hépatocytes sont infectés et qu'*in vitro*, les techniques de culture restent délicates et difficiles, ceci a constitué un obstacle majeur au développement des connaissances sur le stade hépatique et à la recherche d'antigènes exprimés à ce stade.

1.4 Criblage d'antigènes spécifiques de stade

10 La première stratégie pour établir l'expression spécifique de stade est la génération de banques d'ADN complémentaires à partir d'ARN messagers des différents stades. Ceci a été accompli plusieurs fois aux stades sanguins (Chakrabarti et al., 1994; Watanabe et al., 2001) et plus récemment une fois au stade sporozoïte (Fidock et al., 2000). Cependant, cette approche n'est pas
15 possible pour le stade hépatique des plasmodies humains. Un autre moyen est la génération d'anticorps spécifiques dans des modèles animaux. Ceci est facile aux stades érythrocytaires mais pour le stade hépatique, plusieurs tentatives ont échoués, car les injections de stades hépatiques de *P. falciparum* n'ont induit que très peu d'anticorps dans les souris. Une dernière approche est le criblage
20 immunologique basé sur l'utilisation d'anticorps d'individus naturellement immunisés. Cette approche a permis de mettre en évidence pour la première fois que d'autres antigènes que la CS étaient présents à la surface du sporozoïte (Galey et al., 1990).

25 1.5 Stratégie élaborée dans le laboratoire d'identification d'antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires

Afin de contourner la difficulté de criblage aux stades pré-érythrocytaires, une stratégie de criblage d'antigènes de *P. falciparum* potentiellement exprimés dans les stades sporozoïte et hépatique a été développée (Marchand and
30 Druilhe, 1990).

Le principe était de chercher des individus chez lesquels la réponse immune prédominante était contre les stades pré-érythrocytaires. Nous avons

ainsi obtenu des sérums d'individus (sérums PM) vivant en zone d'endémie depuis plus de 20 ans et n'ayant jamais eu d'accès cliniques car ils étaient en permanence sous traitement prophylactique à la chloroquine (schizonticide efficace contre les stades sanguins, mais sans effet sur les stades hépatiques).

- 5 Les sérums correspondants ne reconnaissaient en effet que très faiblement des stades sanguins en Western Blot et en IFI (titres inférieurs à 1/200), tandis que les titres contre les stades sporozoïtes et hépatiques du parasite étaient compris entre 1/3200 et 1/6400 en IFI et ils marquaient plusieurs polypeptides sur des extraits protéiques de sporozoïtes de *P. falciparum*; il s'agissait donc de sérums
10 contenant des anticorps spécifiques des antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires.

Ces sérums ont été utilisés pour cribler une banque génomique de *P. falciparum* (construite par Odile Mercereau Puijalon). L'ADN génomique issu du clone parasitaire T9-96 a été méthylé et digéré par la Dnase 1, et les fragments
15 d'une taille allant de 200 à 2500 paires de bases ont été introduits dans le site *EcoR1* du phage λ gt11 (Guérin-Marchand et al., 1987).

Parmi les 7 millions de fragments d'ADN générés, 2000 clones produisant un antigène recombinant reconnu par des sérums hyper immuns (SHI) d'individus immuns vivant en zone d'endémie, ont ensuite été criblés avec les
20 sérums PM. 120 clones ont ainsi été sélectionnés et l'expression de stade des antigènes correspondants a été déterminée par des tests d'IFIs, avec des anticorps humains immunopurifiés sur chaque protéine recombinante, sur les sporozoïtes, les stades hépatiques et les stades sanguins de *P. falciparum*, *P. yoelii* et parfois avec *P. berghei* et *P. vivax*.

25 Le premier antigène à être étudié et contre lequel les réponses humorales étaient les plus élevées dans plusieurs sérums d'individus vivant dans une zone d'endémie était le Liver Stage Antigen 1, LSA-1 (Guérin-Marchand et al., 1987). Il demeure le seul antigène caractérisé à être exprimé uniquement au stade hépatique.

30 A la suite du LSA-1, 3 antigènes STARP, SALSA et LSA-3 ont été sélectionnés à partir de divers critères et caractérisés au niveau moléculaire (Bottius et al., 1996; Daubersies et al., 2000; Fidock et al., 1994a), et

immunologiquement par L. Benmohammed , K. Brahimi, J.P. Sauzet et B. Perlaza. (BenMohamed et al., 1997; Perlaza et al., 1998; Sauzet et al., 2001). Ces antigènes sont exprimés aussi bien à la surface du sporozoïte qu'au stade hépatique.

- 5 Le LSA3 est l'unique antigène reconnu différenciellement par des sérums de volontaires ou de chimpanzés protégés par l'immunisation avec des sporozoïtes irradiés. Il est le seul à avoir induit une protection stérilisante et de longue durée chez des chimpanzés (Daubersies et al., 2000), et sera bientôt testé dans des essais cliniques de phase I et II.

10

2) MATERIEL ET METHODES

2.1. Techniques de biologie moléculaire

2.1.1. Souches bactériennes

DH5 α : *supE44 Δ lacU169(ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1.*

15

2.1.2. Souches de parasites:

NF54 issue d'un isolat de malade européen infecté en Afrique (ATCC MRA151) (Walliker et al., 1987).

- 20 3D7, la souche référence utilisée dans le projet génome, est un clone issu de la souche (ATCC MRA151) (Walliker et al., 1987).

T9.96, une souche provenant d'un patient thaïlandais ATCC : MRA153 , (Thaithong et al., 1984)

- 25 Pour les tests de polymorphisme, des souches distinctes ont été employées: B1 (Brésil); F32, D7, D28, D50 issues de la Tanzania; D28 du Sénégal, D41 de l'Inde, D51 de Myanmar, L1 de Libéria, H1 de Honduras, Mad20 de Papua New Guinea, et PA de Palo Alto, d'Amérique du Sud Ouest. (Stricker et al., 2000).

Les sporozoïtes sont issues de la souche NF54 et obtenus par passage dans des *Anopheles Gambiae* REF

30

2.1.3. PCR à partir d'extraits de phages ou d'ADN de phages

Le Expand High Fidelity Kit™ (Mannheim Boehringer, Allemagne) a été utilisé comme indiqué par le fournisseur avec 2 mM de MgCl₂, 3.5 unités de Taq polymérase, 0.2 mM de desoxyribonucléotides (dNTP), 50 nM des amorces 21D en 5' (CCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGG; SEQ ID NO : 13) et 26D en 3' (GGTAGCGACCGGCGCTCAGCTGG; SEQ ID NO : 14) et 2 µl d'ADN purifié ou d'extrait de phage. La réaction a comporté une dénaturation initiale de 2 minutes à 94 °C, suivie par 35 cycles consécutifs de 15 secondes de dénaturation à 94 °C, 30 secondes d'hybridation à 50 °C, et 2 minutes d'élongation à 68 °C. Le circuit cyclique a été suivi par une incubation à 68 °C pendant 5 minutes.

2.1.3.1 Sous-clonage dans les vecteurs histidine, pNAK et Topo

Selon la qualité du produit d'amplification des phages, trois procédures ont été employées:

Les produits PCR présentant un smear ou un rendement très petit et étant de plus petite taille quasi impossible à détecter en digérant l'ADN du phage correspondant, ont été clonés par l'intermédiaire d'un vecteur permettant un clonage direct du produit PCR sans digestion successive d'une enzyme de restriction à l'aide du kit de TopoTA Cloning™ (Invitrogen, Les Pays-Bas). Le clonage Topo a aussi été effectué pour les fragments dont nous voulions uniquement déterminer la séquence.

Les produits PCR de tailles inférieures à 1 Kbp ont été digérés, précipités à l'éthanol, et resuspendus dans la moitié du volume initial d'H₂O, puis digérés par 10 U de l'enzyme de restriction *EcoR*1, pendant 1 heure à 37 °C, tirés sur un gel d'agarose à 2 %, purifiés sur gel par la procédure de gel extraction kit de Qiagen, donnant un volume de 50 µl.

Les produits PCR peu abondants de grande taille (supérieurs à 1000 bp) ont été isolés à partir de l'ADN de phage purifié par une digestion avec *EcoR*1, puis par extraction de l'insert du gel d'agarose.

2.1.3.2 Étude du polymorphisme du gène dans des souches parasitaires différentes.

Les amorces suivantes ont été utilisées pour identifier les polymorphismes en taille de régions spécifiques correspondant aux antigènes étudiés.

- 5 747-1: AAAAGTGATGATAGAAATGCTTGTG (5') ; SEQ ID NO : 15
 747-2: TTTTGTTGATCTTACTTATTTCCACC (3') ; SEQ ID NO : 16
 772-1: CGGAATCAGGTTTAAATCCAAC (5') ; SEQ ID NO : 17
 772-2: AGATCGTTTTTCATCAGGGGG (3') ; SEQ ID NO : 18.

10 La réaction cyclique a été effectuée avec un programme comportant une étape initiale d'une dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, suivie par 39 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 2 minutes, une hybridation à 52 °C pendant 1 minute et une élongation à 72°C pendant 2 minutes. Une étape de 5 minutes à 72°C a terminé la réaction.

15 Les PCR ont été effectuées sur un Crocodile III™ de Appligène. Les produits ont ensuite été analysés sur gel d'agarose.

2.1.4. Purification d'ADN

2.1.4.1 Pour les analyses de recombinants

20 Les colonies positives en PCR ont été inoculées dans 3 ml de milieu contenant l'antibiotique correspondant au vecteur utilisé (100 µg/ml ampicilline pour Topo et Histidine, 20 µg/ml kanamycine pour le vecteur Vical) et 2 ml d'inoculum ont été utilisés dans la préparation d'ADN plasmidique avec le Qiagen™ Miniprep Kit. L'ADN obtenu a successivement été digéré avec les enzymes de restriction utilisées dans le clonage et soumis à une électrophorèse
25 sur gel d'agarose, afin de détecter l'insertion du fragment.

2.1.4.2 Pour l'isolement de fragments:

30 100 ml de milieu Luria Broth supplémenté en antibiotique approprié ont été inoculés avec 1 colonie de bactérie comportant le recombinant, et incubé à 37 °C sur la nuit dans un bain thermostaté en agitation vigoureuse. Le lendemain, la culture bactérienne a été récoltée et l'ADN plasmique purifié comme décrit (Qiagen maxiprep™, Qiagen, Allemagne).

2.1.4.3 Pour l'immunisation de constructions ADN nu

Afin d'éliminer les endotoxines, qui sont présents dans les bactéries et qui peuvent entraîner des réponses non spécifiques lors des immunisations de
5 souris, l'ADN des constructions a été purifié à partir de 2 l de culture de bactéries recombinantes, par Qiagen EndoFree Plasmid Giga™ kit (Qiagen, Allemagne).

2.1.4.4 Pour la purification d'ADN de phages recombinants

Les phages ont été réamplifiés sur des boîtes d'agarose de LB, en
10 déposant 5 µl sur du Topagar pris avec 200 µl d'inoculum de Y1090, et en laissant à 37 °C sur la nuit.

Ensuite, une quantité plus grande a été produite en culture liquide. D'abord, une plage piquée sur la boîte a été incubée avec 200 µl d'inoculum de Y1090, laissée à 37 °C avec agitation pendant 15 minutes. Ensuite, 5 ml de
15 milieu sans antibiotique supplémenté avec 10 mM de $MgSO_4$ a été ajouté, et la culture laissée en agitation pendant 4 heures, jusqu'à l'apparition de lyse. 50 µl de Chloroforme a été ajouté, et le tout centrifugé à 7000 g pendant 10 minutes. Après centrifugation, le surnageant libéré des débris cellulaires a été récupéré. Ce stock a été utilisé dans la production de 500 ml de phage en culture liquide :
20 l'équivalent de $7.5 \cdot 10^8$ pfu (unités formant des plaques) a été ajouté à 500 µl de cellules d'une culture inoculée sur la nuit de Y1090, et 500 µl de 10 mM $MgCl_2/CaCl_2$. Tout a été incubé à 37 °C 15 minutes, et ajouté à 500 ml de milieu LB sans antibiotique. La lyse des bactéries observée par l'apparition de filaments dans la culture a été suivie jusqu'à la lyse totale (4-5h). Ensuite, la culture a été
25 centrifugée à 6000 g pendant 15 minutes à 4 °C, le surnageant récupéré, et stocké à 4 °C sur la nuit.

Le lendemain, la purification de l'ADN a été entreprise avec le Lambda Maxi Kit™ (Qiagen, Allemagne) avec des ajustements en début de protocole à cause du volume plus grand de surnageant de départ. Le culot final a été
30 resuspendu dans 500 µl de tampon TE.

2.1.4.5 À partir de parasites

100 µl de culot de culture de globules rouges à 10 % de parasitémie, a été resuspendu dans 100 µl de PBS, pH 7,2 et purifié par le Qiaamp DNA Mini Kit™ (Qiagen, Allemagne). A partir de 100 µl de culot d'une culture parasitée à 10 %, on a obtenu environ 5 µg d'ADN.

2.1.5. Purification d'ARN total parasitaire

Nous avons utilisé deux méthodes en fonction de la quantité d'ARN voulu. Pour des quantités importantes, la méthode décrite par (Kyes et al., 2000) a été employée, tandis que pour obtenir des préparations de quantités plus restreintes, nous avons utilisé le RNeasy kit™ (Qiagen, Allemagne.)

2.1.6. RT-PCR.

La RT-PCR a été effectuée avec le kit RT-PCR de Qiagen (Allemagne). Des amorces spécifiques pour chaque gène et situées, si possible, de telle façon que l'on puisse distinguer entre les produits issus d'amplification d'ADN génomique et d'ARN (autour des introns) ont été utilisées. Une première réaction de Transcription réverse a été effectuée à 50 ° C pendant 30 minutes, puis une réaction de PCR a été effectuée, dans les mêmes conditions que celle décrites pour une PCR d'ADN de parasite avec les amorces sélectionnées, parfois suivi d'une deuxième réaction (nested PCR) avec des amorces situés dans la séquence du premier produit PCR amplifié. Cependant, la température d'hybridation varie en fonction des amorces utilisées (entre 50 et 60 ° C).

2.1.7. Purification des recombinants histidine

2 l de milieu de Luria Broth additionné avec l'ampicilline à 100 ng/ml a été inoculé avec 50 ml de culture de bactérie contenant le plasmide recombinant. La croissance des bactéries a été suivie par la mesure de la turbidité bactérienne à 600 nm et à la densité optique voulue (entre 0,5 et 1) une concentration d'IPTG variant entre 0,5 et 1 mM selon le recombinant a été ajoutée à la culture, et l'induction a duré entre 2 h et 4 h.

Ensuite les cellules ont été récoltées et le culot de bactéries resuspendu dans un tampon de 20 mM de NaPO₄, pH 7.4, et 8 M d'urée (TU) (25 ml/litre de culture bactérienne). Ensuite, la suspension de cellules a été soumise à des sonications de 10 chocs de 1 minute chacun, et le surnageant contenant les protéines recombinantes a été récupéré par centrifugation à 10.000 g pendant 10 minutes, et filtré à 0.22 µm. Ensuite, une étape de purification par affinité sur une colonne de Nickel a été effectuée. Une colonne de 1 ml (HiTrap™, Pharmacia, Suède) a été lavée comme indiqué par le fournisseur et 1 ml de NiCl₂ a été appliqué, suivi par d'autres lavages. Ensuite, la colonne a été lavée avec 5 ml de TU, et le surnageant appliqué sur la colonne. Ensuite, un lavage de 10 ml de TU a été effectué, et le recombinant élué par un gradient croissant en imidazole, compétiteur de l'histidine. Selon le recombinant purifié, des concentrations différentes ont été employées, et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous. Ensuite, le pool de protéines a été dialysé contre un tampon L-histidine pH 6, et chromatographié sur une colonne échangeuse d'anions (HiTrap Q™, Pharmacia, Suède) afin d'éliminer une partie des Lipo Poly Saccharides (LPS) ou endoxines qui induisent des réponses non spécifiques (Morrison and Ryan, 1987).

Tableau de purification des recombinants histidine

Recombinant	Induction ¹			DO après induction	Emplacement de la protéine, Poids moléculaire ²	Imidazole (mM) ³	NaCl (mM) ⁴
	DO	IPTG	Temps				
747	0.5	0.5	4h	2.7	Mem, 18	50	360
772	0.5	0.5	4h	2.2	SN, 35	36	120

1 : La DO mesurée à 600 nm, La concentration en IPTG (mM) ; et le temps d'induction avant récolte.

2 : Après sonication, et centrifugation d'une suspension de bactéries ne contenant pas d'urée (8M) dans le tampon, le surnageant et le culot contenant les débris de membranes bactériennes ont été testés en Western blot afin de détecter où la protéine recombinante se trouvait. En présence d'urée toutes les protéines étaient solubles, et les procédures de purification ont donc été appliquées en présence de 8 M d'urée.

3 : La concentration d'imidazole à laquelle la protéine a été éluée sur la colonne de HiTrap-Ni™

4 : La concentration de NaCl à laquelle la protéine a été éluée sur la colonne de HiTrap-Q™

2.2. Techniques immunologiques

2.2.1. ELISAs (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay)

Les conditions optimales ont été déterminées avec 100 µl de solution d'antigène d'une concentration de 10, 5 ou 1 µg/ml coatés sur les plaques dans
5 50 mM de Carbonate pH 9.6 ou 1X PBS pH 7.4 en incubant les plaques sur la nuit à 4 °C. La saturation a été effectuée, soit en PBS supplémenté par 3 % de lait écrémé, ou 1% de BSA (albumine de sérum de veau) à température ambiante ou à 37°C pendant 2 heures. La dilution de sérums de 100 ou de 200 fois a été effectuée soit avec du PBS/lait à 1.5 % , soit avec du PBS/BSA 1%, et
10 l'incubation a été faite à température ambiante ou à 37°C pendant 1 h.

L'incubation avec les anticorps secondaires couplés à la HRPO (peroxidase de navet) dilués au 1/2000 dans le tampon de dilution des sérums a été effectuée à température ambiante, et les révélations ont été faites à l'aide des tampons de TMB (peroxidase substrate et peroxidase solution B) (Laboratoires
15 Kirkegaard et Perry, USA) mélangés volume à volume immédiatement avant utilisation dont 100 µl ont été distribués dans chaque puit. Les réactions colorées en bleu ont été arrêtées en ajoutant le même volume d'une solution d'1 M d'acide phosphorique. Les réactions sont lues à 450 nm dans un lecteur Multiscan Ascent™ (Labsystems).

20 Les résultats des souris sont exprimés en Ratio (unité arbitraire par rapport aux taux des réponses dans des témoins naïfs) et dans les expériences où les taux des isotypes ont été étudiés, par rapport au Ratio des IgG totaux déterminé dans la même expérience.

2.2.2. Immunopurification d'anticorps spécifiques

Pour l'immunopurification d'anticorps spécifiques contre les recombinants His₆, une méthode décrite par (Brahimi et al., 1993) a été employée. 100 µl/puits de solution d'antigène dans du PBS, pH 7.2, à une concentration de 5 µg/ml ont été adsorbés sur plaques Nunc Maxisorp™ (Nunc, Danemark), et les plaques
30 incubées à +4 °C la nuit. Ensuite, des sérums hyperimmuns ont été incubés à une dilution de 1/50 pendant 1 heure à température ambiante, les plaques lavées et l'élution des anticorps effectuée par ajout de glycine pH 2.5 à 0.2 M, incubation

pendant 3 minutes et récupération suivie par une neutralisation du pH avec du Tris, 1M, pH 11. L'immunopurification à partir de recombinants de fusion β -galactosidase a été effectuée sur des filtres de nitrocellulose, comme décrit (Beall and Mitchell, 1986).

5

2.2.3. SDS-PAGE et Western Blot

En fonction des échantillons à tester, des gels de pourcentage d'acrylamide (BioRad™ 29.1:1 ratio) variables (5, 7.5, 10 ou 12 %) ont été utilisés. Après migration en tampon Tris/glycine (pH 8.5) avec le kit minigel
10 (Biorad, USA) les gels ont soit été colorés par bleu de Coomassie soit soumis à un transfert sur filtres de nitrocellulose (0.45 μ m), dans la cellule Trans-Blot™ (BioRad.)

Après transfert, les protéines ont été visualisées par une coloration avec 0,2 % de rouge Ponceau dans une solution d'acide acétique (5%), puis le filtre a
15 été saturé en TBS/lait écrémé à 5 % pendant 30 minutes. Les anticorps humains immunopurifiés sans dilution, et les sérums dilués 1/100 ou 1/200 dans du TBS/lait 5%/ Tween™ 0,05% ont été incubés pendant 1 à 2 heures à température ambiante. Ensuite, le filtre a été lavé 3 fois 10 minutes en
20 TBS/Tween™ 0,05 %, et incubé avec les antisérums couplés à la phosphatase alcaline dilués 1/5000, pendant 30 minutes. Après lavage dans le même tampon, les réactions colorées ont été produites par l'ajout de NBT (330 μ g/ml) et de BCIP (165 μ g/ml) (Promega, Allemagne) dilués dans du tampon Tris pH 9.

2.2.4. IFI (*Immunofluorescence indirecte*)

25 Toutes les incubations à 37°C ont été effectuées dans une chambre humide afin d'éviter l'assèchement des tissus ou cellules à étudier. Les tampons ont été filtrés par un filtre à 0.22 μ m afin d'éviter des contaminations par d'autres microorganismes et des bruits de fond.

2.2.4.1 Stade sporozoïtes

Après dissection des glandes salivaires de moustiques infectés avec le parasite, les sporozoïtes ont été fixés avec 0.01 % de glutaraldehyde en PBS et lavés soigneusement en PBS.

- 5 Afin d'étudier le marquage uniquement en surface des sporozoïtes, (Galey et al., 1990) a développé une technique permettant une fixation « humide » avec une suspension de sporozoïtes attachés à la polylysine. Les lames de titration (PolyLabo, France) ont été coatées avec 1 µl d'une solution de 50 mg/ml de polylysine, puis laissées sécher une nuit à 37°C. 1 µl d'une suspension de
10 sporozoïtes (20/µl) a été déposée sur chaque puits, et incubé dans une chambre humide à 4°C sur la nuit. La détection d'une présence intra-parasitaire a été faite par fixation des sporozoïtes dans l'acétone.

2.2.4.2 Stade hépatique

- 15 Les coupes fixées au Carnoy et paraffinées ont été préparées par 3 bains de Xylène de 10 mn chacun, 3 bains d'alcool absolu de 5 mn chacun, 2 bains d'eau distillée de 5 mn chacun, et séchées à l'air libre. Ensuite, les coupes ont été réhydratées pendant 10 mn dans du PBS pH 7.4 filtré. Les coupes à
20 congélation ont été fixées 10 minutes en acétone.

2.2.4.3 Stade sanguin.

Les frottis sanguins ont été fixés 10 minutes à l'acétone, et des cases pour chaque échantillon à tester ont été délimitées en dessinant des bords avec un marqueur Pentel-rouge sur le frottis.

- 25 La suite de la technique a été identique pour les trois stades: Après fixation, les anticorps à tester (dilués dans du PBS) ont été déposés sur chaque puit, coupe ou case, et la lame incubée à 37°C en chambre humide pendant 1 heure. Les lames ont été lavées 3 fois 10 minutes dans du PBS 1X, puis incubées avec un anti-IgG anti-humain ou souris (selon les anticorps spécifiques
30 utilisés), couplé à la fluorescéine (Alexis) dilué 1/200 dans du PBS et du bleu d'Evans 1/50000, incubées 30 minutes à 37°C en chambre humide, lavées trois fois en PBS 1X, et couvertes par une lamelle après qu'une goutte de tampon

glycériné (PBS 30 % glycérol) ait été déposée. La lecture de la lame a été effectuée au microscope à U.V (Olympus™ BH2))

2.2.5. Immunisations de souris

5 2.2.5.1 Par les recombinants histidines

Les protocoles a, b et c ont essentiellement été appliqués pour obtenir des sérums spécifiques, tandis que les protocoles b, c et d ont été employés afin d'effectuer des infections d'épreuve par *P. yoelii*.

10 a) Adjuvant IFA/Alum

Des souris BALB/c femelles de 6 semaines ont reçu 1 première injection intra-péritonéale de 500 µl, avec 1 mélange de 20 µg d'antigène (His₆-249, His₆-680, His₆-747, His₆-772), 2 mg/ml d'Alum (Al(OH)₃, et de l'Adjuvant incomplet de Freund (AIF), volume dans volume, supplémenté avec 0.9% de NaCl.

15 Les 2 injections suivantes, chacune à 15 jours d'intervalle, ont été effectuées avec la même quantité d'antigène dans le même volume, mais sans AIF, et avec de la méthiolate, un conservateur, à 0.05%.

Les souris ont été prélevées (500 µl) avant l'immunisation 2 semaines, 1 mois et 6 semaines après la première immunisation, sur EDTA et les plasma
20 récupérés et stockés à -20°C.

b) CFA

Des souris BALB/c femelles de 6 semaines ont reçu 3 injections sous-cutanées tous les 15 jours à la base de la queue d'un mélange constitué par
25 100 µl d'adjuvant complet de Freund et de 10 µg d'antigène (His₆-114 ou His₆-662) dans 100 µl de PBS. 1 semaine après la troisième injection, les sérums des souris ont été prélevés et les réponses testés en ELISAs contre le recombinant et en IFI sur les sporozoïtes. 18 jours après la dernière injection, les souris ont subi une infection d'épreuve par des sporozoïtes de *P. yoelii*.

30

c) SBAS₂ (Adjuvant Smith and Klein Beecham)

Des souris C3H femelles de 7 semaines ont reçu trois injections sous-cutanées à la base de la queue de 100 µl d'un mélange constitué par 57 µl d'adjuvant mélangé avec 43 µl d'antigène (His₆-249, His₆-747 ou His₆-772) correspondant à 10 µg, les injections étant espacées de 3 semaines chacune. 10 jours après la dernière immunisation, les souris ont été prélevées et les sérums correspondants récoltés.

d) Microparticules

Les solutions d'antigènes (His₆-249, His₆-747 ou His₆-772) ont été adsorbées sur des microparticules en polystyrène de 0.5 µm de diamètre (Polysciences Inc, USA) par incubation à 37 °C en agitation pendant 4 heures dans une solution de glycine, pH 8.0. L'adsorption de l'antigène a été vérifiée par la capacité des micro-billes d'agglutiner avec un sérum spécifique à l'antigène adsorbé. Des souris C3H femelles de 7 semaines ont reçu trois injections sous-cutanées à la base de la queue de 100 µl d'un mélange constitué de microbilles coatés avec l'antigène correspondant à 10 µg, les injections étant espacées de 3 semaines chacune. 10 jours après la dernière immunisation, les souris ont été prélevées et les sérums correspondants récoltés.

2.2.5.2 Par les recombinants ADN

Des souris BALB/c et C3H de 6 semaines ont été injectées 3 fois à 8 semaines d'intervalle par voie intramusculaire avec 100 µl d'antigène (pNAK114, pNAK249, pNAK438, pNAK571, pNAK747, pNAK772) dans du PBS pH 7.4, puis une 4^{ème} fois 12 semaines après la 3^{ème} injection. Les prélèvements de sang ont été effectués 1 semaine après la 3^{ème} et la 4^{ème} immunisation sur EDTA, et les sérums récoltés après une incubation du prélèvement la nuit à 4°C.

Les rates de 3 souris /groupe ont été prélevées après la 4^{ème} immunisation, et les stimulations des réponses cellulaires étudiées. Après un 5^{ème} boost, 8 semaines après la 4^{ème} injection, les souris ont subi une infection d'épreuve par des sporozoïtes de *P. yoelii*.

2.2.6. Infection d'épreuves par sporozoïtes et par stade sanguin

Les sporozoïtes issus de moustiques *Anopheles stephensi* infectés par le clone 1.1 de *P. yoelii yoelii* ont été obtenus par une méthode (Ozaki et al., 1984) qui consiste en l'isolement de la cage thoracique du moustique et l'obtention par centrifugation à travers de la laine de verre des sporozoïtes, qui ont été lavés par des resuspensions successives en PBS après centrifugation.

Les souris ont été infectées par des sporozoïtes de *P. yoelii* par voie rétro orbitale avec 150 à 200 sporozoïtes (200 µl/ injection), et la parasitémie suivie par des frottis du jour 3 suivant l'infection jusqu'au 12ème jour post-infection, aussi bien sur les animaux immunisés que sur des souris naïves infectées par le même lot de sporozoïtes.

Des stades sanguins prélevés sur d'autres souris infectées par *P. yoelii* ont été lavés dans du PBS, et l'équivalent de 5×10^4 parasites ont été injectés par voie intrapéritonéale.

15

2.2.7. Étude des réponses cellulaires.

Afin d'étudier aussi bien l'induction de prolifération de cellules-T spécifiques ainsi que la sécrétion de cytokines capables de stimuler la réponse immune, nous avons étudié la stimulation de splénocytes de souris par les antigènes et la sécrétion d'IFN-γ par ces cellules.

20

2.2.7.1 Proliférations de lymphocytes T

Les rates ont été prélevées sur les souris, les suspensions de splénocytes ont été lavées deux fois dans du RPMI 1640™ (Gibco, France) et les cellules resuspendues à une concentration finale de 5×10^6 cellules /ml dans du RPMI supplémenté avec 100 U/ml pénicilline, 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes, 50 µM β-mercaptoéthanol, 1,5% sérum de veau fœtal (SVF) et 0,5 % de sérum de souris normal. 100 µl/puits de chaque suspension a été distribuée dans des plaques de 96 puits à fond rond (Costar, USA) et les protéines recombinantes à tester ont été ajoutés à une concentration de 50 mg/ml. Ces tests ont été effectués en triplicat. Après 48 h d'incubation, (37 °C avec 5 % de CO₂), 50 µl/puits de surnageant de culture a été prélevé et stocké à -70 °C avant la

25

30

détermination de titres d'IFN- γ . 50 μ l/puit de surnageant a été prélevé pour dosage de cytokines. Afin de détecter la réplication d'ADN due à une stimulation de division, 50 μ l d'une solution de thymidine tritiée (3 H) (Amersham Life Science, England) à 1 μ Ci/puits a été ajoutée durant les 12 dernières heures d'incubation.

- 5 Les cellules ont été récoltées dans un récolteur de cellules automatique (Skatron Inc, Sterling, VA, USA), et l'incorporation de Thymidine 3 H quantifiée par scintillation. Les résultats sont exprimés en Index de Stimulation (I.S.) et la prolifération a été considérée comme positive, lorsque le S.I. est au dessus de 2.

10 2.2.7.2 Détection de sécrétion d'interféron γ (IFN- γ)

- Les titres d'IFN- γ dans les surnageants de culture ont été déterminés par un méthode d'ELISA à double capture. Des plaques Maxisorp™ (Nunc, Danemark) à fond plat ont été coatées par un anticorps monoclonal de rat anti-IFN- γ de souris primaire (R4-6A2) (Pharmingen, San Diego, CA) dilué dans un
15 tampon de 0.1 M de carbonate, pH 9.6, et laissé sur la nuit à 4 °C. Entre chaque étape de la procédure, les plaques ont été lavées plusieurs fois avec du tampon PBS supplémenté avec 0,05 % Tween™ (PBS-T). Ensuite, les plaques ont été saturées avec 3% d'albumine de sérum de veau (BSA, Sigma Chemicals, St Louis, USA) dans du PBS-T. Des surnageants non-dilués ont été ajoutés aux
20 puits et les plaques incubées sur la nuit à 4°C, suivi par une incubation 1 h à température ambiante avec un anticorps monoclonal rat anti-souris IFN- γ secondaire biotinylé (XMG1.2™, Pharmingen, San Diego, CA) dilué dans du PBS-T. Les étapes de marquage avec des anticorps couplés à la peroxidase sont identiques à celles utilisées dans la technique de l'ELISA. (A.2.1)

25

2.2.7.3 Détection de cellules sécrétrices d'IFN- γ par Elispot

- Le nombre de cellules sécrétrices d'IFN- γ a été déterminé dans des splénocytes non stimulées 40 heures après qu'elles soient fraîchement isolées et incubés avec les antigènes. Des plaques de microtitrage (Multiscreen-HA™,
30 plaque stérile, Millipore) ont été coatées par 50 μ l d'une solution contenant 5 μ g/ml d'anticorps anti-IFN- γ (18181D™, Becton Dickinson Co). Après une

incubation sur la nuit à 4 °C, les puits ont été lavés et saturés par une solution de 5 % de SVF. Des suspensions de cellules de 5×10^5 cellules/puit ont été incubées avec l'antigène à 50 µg/ml dans un volume total de 200 µl pendant 40 h, à 37 °C dans une atmosphère humidifiée de 5 % de CO₂. Les plaques ont
5 ensuite été lavées 3 fois avec du PBS-T et 3 fois avec du PBS seul et les puits ont alors été coatés par 50µl de solution d'anticorps anti-souris IFN-γ biotinylé (Becton Dickinson Co, USA) dilué au 1/200 et incubé sur la nuit à 4 °C. Les plaques ont ensuite été lavées de la même façon que précédemment, avant un ajout de 50 µl par puit de phosphatase alcaline couplée à la streptavidine
10 (Boehringer-Mannheim, Allemagne) à une dilution de 1/2000 dans du PBS. Après 1 h d'incubation, et lavage des plaques, des spots ont été détectés par développement d'une réaction colorée avec les réactifs BCIP/NBT à 50 µg/ml à l'endroit où des cellules individuelles ont sécrété de l'IFN-γ. Les résultats sont exprimés comme le nombre de cellules formant des spots par rapport aux 5×10^6
15 splénocytes.

2.2.8. Sérums et cellules

2.2.8.1 D'individus naturellement exposés au parasite.

10 sérums provenant d'adultes vivant dans une forte zone d'endémie
20 (Côte d'Ivoire) et naturellement protégés ont été employés dans des études d'ELISA et des immunopurifications d'anticorps spécifiques aux antigènes étudiés.

Des sérums provenant d'individus de deux tranches d'ages allant de 0 -9 ans ou au dessus de 12 ans, ont été sélectionnés des Villages Ndiop et Dielmo
25 (Rogier and Trape, 1995; Trape et al., 1994). Ndiop est situé dans une zone d'endémie qui compte environ 20 piqûres infectieuses/an, et Dielmo, dans une zone qui compte 150 piqûres infectieuses/an. Chaque sérum dans une des deux régions correspond en age et en sexe à un sérum de l'autre région.

30 2.2.8.2 D'animaux ou d'humains immunisés avec des sporozoïtes irradiés.

Deux chimpanzés ont été immunisés soit avec des sporozoïtes irradiés à 18 kRad, soit à 30 kRad par 4 injections de 5×10^6 sporozoïtes chacune par voie

intravéneuse. Les 3 premières immunisations ont été effectuées avec 1 mois d'intervalle, tandis que la 4^{ème} a été effectuée 4 mois après la 3^{ème}. Leur sérum et les cellules du sang périphérique ont été étudiés dans des tests de réponses cellulaires et de réponses humorales après 3 immunisations. Les deux animaux
5 ont été infectés par l'injection intravéneuse de 4×10^4 sporozoïtes (faible dose) chacune de *P. falciparum* et seulement le chimpanzé immunisé avec les sporozoïtes irradiés à 18 kRad a été protégé (n'a pas développé de parasitémie sanguine).

Deux volontaires humains immunisés par le même moyen, ont reçu un
10 rappel avec un nouveau lot de sporozoïtes irradiés, et les cellules du sang périphérique ont été étudiées dans des tests d'Elispot. De plus, le sérum de 4 volontaires humains immunisés avec des sporozoïtes irradiés a également été à la disposition de la Demanderesse.

15 2.2.8.3 D'individus exposés différemment au parasite

Nous avons à notre disposition des sérums de 8 individus exposés naturellement au parasite mais sous traitement de chloroquine permanent, ce qui élimine les stades sanguins à une forme très précoce et des sérums de 5
20 individus accidentellement infectés par la transfusion de sang infecté par *P. falciparum*.

3) RESULTATS

3.0: Exemple 1

Identification de deux antigènes nouveaux DG47 et DG772 de *P. falciparum* reconnus par des volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradié
25

Les clones DG 747 et DG772 ont été sélectionnés non seulement à cause des critères initiaux posés (détection sur les sporozoïtes et le stade hépatique, ainsi qu'une reconnaissance par des sérums hyperimmuns), mais parce que plusieurs caractéristiques supplémentaires nous ont intéressés : le DG747 n'avait
30 aucune réactivité croisée avec d'autres protéines de la banque PM, et le DG772 n'avait qu'une seule réactivité croisée, avec LSA1, le seul antigène identifié

comme exprimé uniquement au stade hépatique de *P. falciparum*. De plus, des anticorps spécifiques des deux protéines marquaient des sporozoïtes de *P. yoelii*.

Un séquençage initial a révélé que ces deux clones contenaient des inserts appartenant à des gènes jusqu'ici inconnus, mais dont la séquence était
5 disponible sur les bases de données du génome de *P. falciparum*. Nous nous sommes donc consacrés au travail de la caractérisation moléculaire d'expression du stade, de la conservation du gène, ainsi qu'à un travail de caractérisation immunologique (antigénicité, immunogénicité) de ces nouveaux antigènes. Les
10 résultats ont montré que a) ces deux antigènes induisent une réponse immune chez des individus ou des animaux uniquement exposés aux stades pré-érythrocytaires aussi bien artificiellement (par immunisation) que naturellement (sur le terrain), b) qu'ils sont reconnus par des sérums d'individus naturellement exposés au cycle entier du parasite, aussi bien dans des zones de faible que de forte endémie. De plus, nous avons évalué chez la souris leur potentiel
15 immunogène et protecteur par l'immunisation et l'infection d'épreuve par *P. yoelii*.

3.1. Analyse des séquences

DG747 code pour un polypeptide de 59 acides aminés dont les 40 acides aminés (aa) C-terminaux font partie d'une structure répétitive de 5 x 8 aa riches
20 en arginine et en lysine. Cette séquence est identique aux aa 81-140 du gène PfB0155c (1524 pb, 508 aa) situé sur le chromosome 2 (Figure 3.1a). Ce gène qui code pour une protéine putative (Gardner et al., 1999), ne comporte ni introns, ni peptide signal prédits, ni de régions homologues à d'autres protéines qu'elles soient de *Plasmodium* ou d'autres organismes. La protéine
25 correspondante a une masse moléculaire théorique de 59 kDa, et un point isoélectrique neutre (7.5), mais certaines régions ont des pI très variables, par exemple la région retrouvée dans DG747 a une charge positive à pH neutre.

DG772 contient un insert de 333 pb, qui sont traduits en 111 aa contenus dans un cadre de lecture ouvert. Ce polypeptide correspond à la région des aa
30 1146-1256 d'une protéine de 1493 acides aminés codée par un gène situé sur le chromosome 1 (figure 3.1b). La masse théorique de la protéine est de 173 kDa et le point isoélectrique est de 5.05. La protéine est constituée en majorité d'acides

aminés polaires et ne contient pas de sites hydrophobes, à part dans la partie N-terminale, où il pourrait y avoir un site d'ancrage de GPI. Le gène ne contient pas de répétitions et la séquence nucléotidique traduite a une forte homologie avec les protéines de la famille « EBP » (Adams et al., 1992), c'est-à-dire avec des régions 5'cys et 3'cys qui sont caractéristiques de cette famille.

3.2. Expression de stade et conservation du gène

Afin d'évaluer plus précisément l'expression de stade des deux protéines, nous avons utilisé les techniques d'IFI et de Western blot sur des stades différents de *P. falciparum* et sur les parasites murins *P. yoelii* et *P. berghei*.

La surface des sporozoïtes de *P. falciparum* a été marquée par les anticorps (humains ou de souris) spécifiques de DG747 et de DG772, mais les stades érythrocytaires ont été marqués d'une façon différente pour les deux groupes d'anticorps. Les anticorps anti-His₆-747 (anti-747) marquent peu les stades jeunes, mais fortement les stades schizontes mûrs, avec un marquage localisé autour des structures knob (Figure 3.2 image A), tandis que les anticorps anti-His₆-772 (anti-772) marquent le parasite d'une façon plus homogène tout au long du stade érythrocytaire. Dans les espèces murines *P. yoelii* et *P. berghei*, la surface des sporozoïtes a été fortement marquée par les anticorps spécifiques des deux antigènes.

Afin de définir les tailles des protéines détectées, nous avons aussi effectué un Western Blot des extraits protéiques de parasites sanguins de *P. falciparum* avec les mêmes anticorps (Figures 3.3 a et b). Les anticorps anti-747 marquent un polypeptide d'environ 70 kDa aussi bien dans les extraits d'anneaux que ceux de schizontes, tandis qu'aucune bande n'a été détectée dans les érythrocytes non parasités. Le polypeptide détecté par des anticorps anti-772 est plus grand, d'une masse moléculaire de 150 kDa, et est détecté aussi bien dans les anneaux que dans les schizontes. Le marquage d'extraits protéiques de *P. yoelii* a détecté un polypeptide de 70 kDa pour les anti-747 dans les sporozoïtes et les stades sanguins et un polypeptide de 60 kDa pour les anti-772, seulement détecté dans les sporozoïtes de *P. yoelii*.

De plus, afin de confirmer la présence des protéines et leur constance d'expression à la surface des sporozoïtes provenant de plusieurs parasites différents, nous avons examiné par IFI des lots de sporozoïtes provenant de différents isolats Thai de *P. falciparum*. Le sérum anti-772 a marqué tous les sporozoïtes, tandis que seulement 7 sur 10 des isolats testés étaient marqués par les anti-747. De même, des amplifications par PCR avec des amorces spécifiques pour les deux fragments de gène (indiquées dans les Figure 3.1a et 3.1b) ont été effectuées avec de l'ADN issu de stades sanguins de 12 souches différentes de *P. falciparum* (Figure 3.4). Les produits PCR correspondant au DG772 ont été amplifiés à partir des 12 échantillons et leur taille était similaire, tandis que les amorces spécifiques pour DG747 n'ont pu amplifier un fragment qu'à partir de 9 des 12 ADN. Il faut préciser que toutes les lignées de parasites utilisées dans ce travail (T9-96, NF54 et 3D7) contiennent les gènes correspondants. Ces résultats indiquent une variation au niveau de l'expression ou de la présence de DG747 dans des souches parasitaires, car au total, seulement 15 sur 22 parasites ont semblé contenir le gène du DG747 ou ont montré une réactivité positive en IFI.

3.3. Reconnaissance par le système immunitaire humain dans des zones endémiques

En plus de l'étude de la constance d'expression de l'antigène, nous avons étudié la prévalence des réponses humorales d'individus vivant dans des zones de forte (Dielmo) ou de faible (Ndiop) endémie, et dans deux groupes d'âge différents dans ces deux zones (Figures 3.5a et 3.5b)

On observe une même prévalence (40 %) contre 747 dans la zone de faible endémie, sauf que le nombre d'individus qui répondent fortement (l'intensité de réponse par rapport aux témoins) augmente avec l'âge. Dans la zone de forte endémie, le nombre de répondants contre 747 augmentent avec l'âge, ainsi que l'intensité de la réponse, et la prévalence chez les adultes, que l'on peut considérer comme ayant acquis une immunité, est de 85 %. De plus, ces réponses semblent corrélées avec l'exposition au sporozoïte, car le taux d'anticorps est plus élevé chez les individus d'un groupe d'âge donné dans une

zone de transmission plus forte. Toutefois, dans une même zone, la réponse n'a pas changé d'une façon significative durant des saisons de plus faible transmission (saison sèche) (résultats non montrés), ce qui pourrait correspondre à la réponse contre les stades sanguins et/ou indiquer que la réponse immune anti-747 est de longue durée. La réponse induite par DG747 augmente en prévalence et en intensité en fonction de l'exposition et de la durée d'exposition au parasite (âge).

La réponse anti-772 augmente comme l'anti-747 en fonction de l'âge, mais avec une augmentation beaucoup moins importante, par rapport au taux de transmission observé entre Ndiop et Dielmo et par rapport à l'âge. Le taux de réponses anti-772 mesuré en % de prévalence et en intensité est plus élevé pour les individus de bas âge que celui des réponses anti-747, mais moins forte (75%) que l'anti-747 (85%) à Dielmo dans les individus immuns.

3.4. Comparaison des réponses induites par des stades différents du parasite

Nous avons le privilège d'être en possession de cellules issues d'individus immunisés avec des sporozoïtes irradiés, et de sérums provenant de personnes exposées de façon différente à l'infection parasitaire.

3.4.1. Réponses cellulaires

Toutes ces études ont été effectuées en étroite collaboration avec Jean-Pierre Sauzet dans le laboratoire. Compte tenu du peu de matériel dont nous disposions, nous avons restreint les analyses afin de détecter ce que nous avons précédemment défini comme un des critères importants (rôle dans la protection) pour l'évaluation d'un potentiel vaccinal au stade pré-érythrocytaire. Nous avons étudié la sécrétion de IFN- γ de cellules issues de 2 individus immunisés avec des sporozoïtes irradiés de *P. falciparum*, car nous avons observé, lors de l'analyse d'autres antigènes, et en particulier de LSA3, un candidat vaccin étudié dans notre laboratoire (Daubersies et al., 2000), que le taux de sécrétion de cette cytokine semble être corrélé à la protection. Chez ces deux volontaires, le nombre de cellules sécrétant l'IFN- γ contre DG747 et DG772 est aussi élevé que

pour les recombinants issus de LSA3 (729 et PC), (Figure 3.6a). De plus, nous avons examiné si les réponses immunes cellulaires mesurées par la prolifération de lymphocytes T et la sécrétion d'IFN- γ différaient entre deux chimpanzés immunisés avec les sporozoïtes irradiés de *P. falciparum*, mais dont un n'était pas protégé, (Figure 3.6b).

Les cellules du système immunitaire de l'animal immunisé avec les sporozoïtes irradiés viables (18 kRad) et ultérieurement protégé, ont reconnu les antigènes DG747 et DG772, ainsi que l'ont fait les cellules de l'animal immunisé avec des sporozoïtes irradiés non-viables (30 kRad), et pas protégé lors d'une infection d'épreuve.

Les proliférations lymphocytaires sont à la limite de la valeur seuil, tandis que les taux de sécrétion d'IFN- γ sont élevés, aussi bien pour la quantité de cytokine détectée que pour le nombre de cellules sécrétrices (détecté par Elispot). Ceci est valable aussi bien pour les animaux efficacement immunisés et ceux n'étant pas protégés. Cependant, il semble que les taux de réponses sont plus élevés pour les animaux immunisés avec les sporozoïtes irradiés de 30 kRad. Les réponses induites par 747 sont plus fortes que celles qu'induit 772, et les deux plus fortes que celles induites par LSA3.

Les cellules prélevées sur des animaux ayant subi une immunisation supplémentaire par les sporozoïtes irradiés ont été endommagées lors du transport à partir du centre de primatologie en Afrique, et nous n'avons donc pas pu étudier la présence d'un « boost » induit contre ces antigènes.

3.4.2. Étude des réponses humorales

Nous n'étions pas en possession des cellules de tous les groupes humains exposés de façon différente à l'infection parasitaire, mais nous avons pu étudier en détail la réponse humorale (isotypes d'IgG) de volontaires immunisés avec des sporozoïtes irradiés (ISS, seulement exposés aux stades pré-érythrocytaires), d'individus naturellement immuns vivant en zone de forte endémie (exposés à tous les stades du parasite), et d'un individu ayant été accidentellement infecté par le paludisme par transfusion sanguine, (uniquement exposé aux stades sanguins) (Figures 3.7a et 3.7b).

Pour les deux antigènes, la différence la plus grande est observée pour l'isotype cytophile IgG1 dont le taux est beaucoup plus élevé dans le sérum d'individus immuns (SHI) que dans le sérum issu du malade infecté par transfusion ou de volontaires ISS. Les réponses de ces deux derniers groupes sont assez semblables et ne font pas apparaître de déséquilibre entre anticorps cytophiles (IgG1 et IgG3) et non cytophiles (IgG2 et IgG4). Nous avons en outre remarqué que le sérum issu d'un individu exposé longuement au parasite, mais sous prophylaxie permanente (le PM), a le même profil en isotypes que les ISS.

10 3.5. Immunogénicité chez la souris

Des souris de deux souches différentes ont été immunisées avec les recombinants sous formes de protéines, avec des adjuvants différents ou sous forme de constructions d'ADN « nu », sans adjuvant.

Une étude préliminaire avec une construction ADN nu ne comportant pas de séquence signal permettant l'exportation de la protéine synthétisée a été effectuée. Les souris immunisées n'ont généré aucune réponse humorale, que cela soit pour ces deux antigènes ou pour d'autres étudiés simultanément. Cependant, nous avons détecté des réponses cellulaires spécifiques anti-747 et anti-772. Aussi bien les proliférations de lymphocytes T que le taux de sécrétion d'IFN- γ ont été testés pour deux souches de souris, la C3H et la BALB/c. Les profils de réponses sont présentés dans les Tableaux 3.1a et 3.1b où l'on peut remarquer que pour le cas des réponses cellulaires de souris immunisées avec pNAK747, il y a aussi bien des stimulations de prolifération que de sécrétion d'IFN- γ , tandis que pour pNAK772, les proliférations des cellules T ont été très peu stimulées par rapport à la stimulation de sécrétion d'IFN- γ qui est considérable. Parmi toutes les souris immunisées, le niveau le plus élevé de sécrétions d'IFN- γ est observé lorsque le niveau de stimulation de prolifération est le plus bas.

Les vaccinations par les autres formulations (protéine recombinante et ADN nu avec une séquence signal) ont toutes induit une réponse humorale chez les souris (Figure 3.8). Tous les sérums issus de ces souris immunisées

reconnaissent la protéine native en tests d'IFI et le marquage correspond avec celui observé pour les anticorps humains immunopurifiés.

Les réponses anti-747 présentent un profil similaire pour toutes les souris immunisées et toutes les formulations utilisées, avec une réponse isotypique à prépondérance IgG2b. Les réponses anti-772 sont aussi similaires entre souris et formulations de vaccins, mais avec une nette prédominance des IgG1. Le profil isotypique dépend donc de l'immunogène plus que du mode de présentation utilisé. Cependant, les titres à point final sont beaucoup plus élevés lorsque l'on immunise avec des protéines recombinantes (1/200.000) par rapport à l'ADN (1/2000), et les titres des sérums de souris immunisées avec His₆-772 sont plus élevés que ceux des His₆-747.

Puisque nous avons observé une réactivité croisée avec le stade sporozoïte de *P. yoelii*, nous avons testé le potentiel protecteur de ces antigènes par l'infection avec des sporozoïtes de cette espèce de souris immunisées avec les protéines recombinantes. La parasitémie a été suivie par l'observation des formes sanguines sur des frottis à partir du jour 3 de l'infection et pendant 12 jours consécutifs. Nous n'avons observé aucune protection quelle que soit la souche de souris utilisée, car la parasitémie a été détectée au même jour que celle des souris non immunisées, et la courbe était semblable à celle des souris témoins (résultats non-montrés).

3.6 Données supplémentaires

3.6.1 DG772

Par RT-PCR sur l'ARN total issu de sporozoïtes et de parasites sanguins, les inventeurs ont pu déterminer les sites d'épissage de l'ARN messager correspondant au gène codant. La séquence des amorces a été extraite des données du génome de *Plasmodium falciparum*.

Les produits d'amplification sont de tailles identiques dans les stades sporozoïtes et les stades sanguins, et différent de la taille du produit obtenu par amplification de l'ADN génomique et par séquençage les sites d'épissages se sont avérés d'être identiques (voir les introns indiqués dans la figure).

Le gène codant pour DG772 appartient à une famille de protéines identifiés par un motif partagé. Toutes les protéines de la famille des EBP (Erythrocyte Binding Proteins) partagent des motifs conservés de résidus cystéine dont l'agencement est similaire pour toutes les protéines. Cependant, le
5 degré d'identité ne dépasse pas 31 % (max. 57 % d'homologie), même dans les régions les plus conservées.

3.6.2 Tests d'immunogénicité envisagés dans les humains.

D'après nos résultats obtenus dans les souris, nous pouvons confirmer
10 que les antigènes DG747 et DG772 employés aussi bien sous forme d'ADN que sous forme de protéine recombinante sont immunogènes. De plus, du fait que les protéines recombinantes sont reconnues par des individus immunisés et protégés contre l'infection par des sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* indique un rôle de ces antigènes dans l'immunité pré-érythrocytaire. Un test dans des
15 primates, et en particulier des chimpanzés permettra de choisir facilement la formulation optimale pour des tests cliniques chez l'humain.

Dans les essais de phase I, afin d'étudier l'immunogénicité et la sûreté du produit, nous envisageons trois formulations toutes préparées dans des conditions GMP: 1) l'antigène sous forme de protéine recombinante purifiée à
20 partir de la bactérie *Lactococcus lactis* (utilisation permise dans les humains) adjuvée avec l'adjuvant SBAS2 (GSK) ; 2) la construction d'ADN dans le vecteur Vical™ (Avantis Pasteur) ; et 3) des lipopeptides synthétiques injectés sans aucun adjuvant (v. LSA3) . Ces formulations vont être distribuées par injection sous-cutanée (au niveau du deltoïde). Par des tests préliminaires, nous savons
25 que les antigènes His₆-747 et His₆-772 induisent des réponses cellulaires et des réponses humorales chez des individus n'ayant été exposés uniquement aux stades pré-érythrocytaires. Nous allons ensuite étudier les réponses cellulaires et les réponses humorales des individus immunisés par les formulations choisies en les comparant avec celles observées dans des individus immunisés avec des
30 sporozoïtes atténués par irradiation et protégés contre une infection d'épreuve avec des sporozoïtes non-atténués. En fonction de ces réponses, une infection d'épreuve avec des sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* sera envisagée.

3.6.3 Homologie avec d'autres séquences nucléotidiques.

Une hybridation par Southern blot dans les conditions stringentes standard (0.1 X SSC, 60 °C) ne donnerait lieu à aucune autre hybridation qu'avec le gène correspondant.

3.6.4 Recherche d'homologie par des moyens bioinformatique

Les recherches ont été effectuées avec le logiciel BLAST™ (tblastx et blastn) sur toutes les bases de données disponibles du génome de *Plasmodium falciparum* ainsi que les bases de données d'autres organismes. Les paramètres utilisées sont les paramètres de défaut trouvées sur les site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

3.7 Discussion

Ce travail qui fait partie de l'étude des antigènes exprimés aux stades pré-érythrocytaires nous a permis une première caractérisation et l'évaluation du potentiel vaccinal de deux nouveaux antigènes de *P. falciparum*. Ces deux antigènes ont des caractéristiques différentes au niveau moléculaire. D'une part, la protéine dont fait partie le DG747 contient des répétitions, tandis que la molécule contenant le DG772 n'a aucune répétition directe. Le gène Pfb0155c codant pour DG747 est petit (1524 bp) et contient une région répétitive à laquelle appartient DG747. Nous n'avons pas pu détecter la présence du gène par PCR dans toutes les souches, ni pu observer une réactivité avec toutes les souches de sporozoïtes étudiées. L'absence observée peut être due à une réelle délétion du gène ou aux procédures expérimentales. En effet, une des amorces utilisées pour la détection de la partie codante pour DG747 chevauche la partie répétitive, ce qui peut entraîner une difficulté à amplifier un gène contenant une répétition plus grande, ou à détecter un gène contenant moins de répétitions. De plus, ceci est aussi le cas pour la détection en immunofluorescence indirecte où un nombre éventuel de variations de répétitions peut changer l'affinité des anticorps spécifiques, si l'épitope cible chevauche cette région. L'expression détectée par IFI semble être présente tout au long du cycle parasitaire asexué dans l'hôte

vertébré (nous n'avons pas analysé les stades sexuels). Malgré la présence de répétitions dans le DG747, nous n'avons pas détecté de réactivité croisée avec d'autres antigènes de *P. falciparum*. La séquence du gène entier n'a pas d'homologie avec d'autres protéines plasmodiales jusqu'ici identifiées, et nous
5 n'avons pas encore d'indications sur une fonction biologique éventuelle.

Le DG772 ne contient pas de répétitions et sa présence semble être constante, qu'elle soit détectée par PCR ou par IFI. Au niveau biologique, le gène codant pour DG772 s'avère être intéressant. Nous avons trouvé par homologie de séquence que ce gène de 5300 bp de cadre de lecture ouverte fait partie de la
10 famille des EBP (Erythrocyte Binding Protein) (Adams et al., 1992), mais que la séquence de DG772 n'appartient pas aux régions conservées de cette famille, il ne partage qu'une petite partie de séquences avec l'extrémité N-terminale de la région 3'cys. D'ailleurs, il n'a pas de réactivités croisées ni d'homologie de séquence avec DG249, un autre clone faisant partie d'une des parties consensus
15 du gène codant pour EBA-175. Il se peut que DG772 fasse partie d'une région qui confère une particularité à chaque molécule de cette famille. La présence de deux molécules de la famille d'EBP (EBA-175 et 772) sur les sporozoïtes pourrait impliquer qu'il existe plusieurs molécules de cette famille qui interviendraient de façon alternative dans le processus d'invasion comme décrit dans les stades
20 sanguins.

Une connaissance de la prévalence est utile lors de l'évaluation d'un candidat vaccin, et les prévalences obtenues pour DG747 et DG772, de 85% et 75%, sont importantes. Cette étude a montré l'antigénicité importante d'une petite partie des deux molécules, et a suggéré qu'il y aurait un intérêt à étudier plus en
25 détail d'autres epitopes de la même molécule. La réponse humorale détectée contre DG747 et DG772 dans des individus exposés en permanence indique qu'il y a une prépondérance en réponse IgG1 (type cytophile) développée lors d'une exposition soutenue qui n'est pas retrouvée dans le cas de paludisme transfusionnel. Par contre, les profils de réponses humorales obtenus pour deux
30 groupes exposés aux stades pré-érythrocytaires à plus ou moins longue durée (PM et ISS) se ressemblent, et le niveau d'IgG1 est bas, ce qui indique que cet isotype traduit l'exposition répétée de l'antigène aux stades sanguins. L'étude

des réponses cellulaires dans ces mêmes zones devra être effectuée afin d'avoir une notion plus précise des réponses immunitaires induites par ces antigènes.

Aux stades pré-érythrocytaires, nous avons observé une induction de réponse cellulaire par ces antigènes aussi bien dans des chimpanzés que chez
5 des humains. Nous avons observé la sécrétion IFN- γ , décrit comme un facteur intervenant dans la protection contre les stades pré-érythrocytaires. La différence de réponse observée chez les chimpanzés en fonction de la dose d'irradiation pourrait signifier que les antigènes sont reconnus aussi bien sur les sporozoïtes que dans les stades hépatiques. En effet, les sporozoïtes irradiés à 30 kRad sont
10 incapables de pénétrer dans l'hépatocyte, et les réponses détectées sont donc seulement dues à cette exposition, tandis que les sporozoïtes irradiés à 18 kRad se développent dans l'hépatocyte, et les réponses détectées sont donc dues à ce stade. Il serait intéressant d'étudier de plus près les réponses induites dans ces deux animaux (restriction MHC1), et l'induction de « boost » de réponse lors de
15 plusieurs immunisations successives. Ce travail a aussi montré que dans ces deux fragments d'antigènes, il existe aussi bien des épitopes T que des épitopes B.

L'immunogénicité induite par les deux antigènes dans la souris est différente avec une prédominance d'IgG1 pour le DG772, qui n'est pas observée
20 pour DG747. Par contre, nous n'avons observé aucune différence dans les réponses en fonction des formulations, ce qui est intéressant car la présentation des molécules n'est pas identique pour chaque formulation. Les réponses cellulaires uniquement obtenues pour la formulation n'ayant pas induit de réponses humorales détectables montre qu'il y a eu aussi bien des proliférations
25 de lymphocytes, que des sécrétions d'IFN- γ en fonction des souris.

Tableau D1:Récapitulatif des antigènes pré-érythrocytaires du paludisme connus à présent*.

Antigène	Références ¹	Stades d'expression ²				Localisation ³	Structure	
		S	H	SSA	SSS		Intron	
CS	(Nardin et al., 1982)	+	j	-	-	CHR3	+	
LSA1	(Guérin-Marchand et al., 1987)	+	j,m	-	-	CHR4	-	
TRAP	(Robson et al., 1988)	+	j,m	m	-	CHR13	-	
PfHsp70	(Renia et al., 1990)	+	j,m	j,m	-	CHR13		
STARP	(Fidock et al., 1994)	+	j,m	-	-	CHR12	+	
EXP-1	(Koenen et al., 1984), (Sanchez et al., 1994)	-	m	j,m	Nt	CHR12	-	
Pfs16	(Bruce et al., 1990)	+	nt	-	+	?	-	
SALSA	(Bottius et al., 1996)	+	j,m	-	-	CHR2	+	
LSA3	(Daubersies et al., 2000)	+	j,m	-	-	CHR2	+	
PfEMP3	(Pasloske et al., 1993), (Grüner et al., 2001)	+	j,m	j,m	-	CHR2	+	
GLURP	(Borre et al., 1991)	+	m	j,m	Nt	CHR10	-	
EBA-175	(Camus and Hadley, 1985)	+	j,m	j,m	-	CHR4,13 ?	+	
DG747		+	j,m	j,m	-	CHR2	?	
DG772		+	j,m	j,m	-	CHR1	+	

* Les antigènes en gris sont les antigènes caractérisés dans cette demande.

5 NT : Non testé

1 : La présence aux stades pré-érythrocytaires d'autres antigènes (MSP-1) a aussi été suggérée, mais les résultats préliminaires restent à confirmer. Les références soulignées indiquent l'année de découverte de l'expression pré-érythrocytaire.

2. S : sporozoïte ; H : Stade hépatique jeune et mûr ; SSA : Stade Sanguin asexué jeune et mûr ; SSS : Stade sanguin sexué. 3. ST : sub-télomérique. Les caractères en gras indiquent la forme du stade où le marquage est le plus intense.

10 3. La plupart des localisations chromosomales a été faites par recherche d'homologie sur des bases de données

**Tableau 3.1a: Stimulation de proliférations cellulaires et de sécrétion
d'IFN- γ par His₆-747 après 3 immunisations avec pNAK747.**

Souche de souris	Prolifération lymphocytaire Index de stimulation		Interféron gamma IU/ml	
	His ₆ -747	pGEX- NN	His ₆ -747	pGEX- NN
C3H	8.6 \pm 3.0	3.2 \pm 1.1	7.0 \pm 0.4	4.0 \pm 0.
C3H	23.6 \pm 5.9	8.8 \pm 2.9	7.0 \pm 0.7	4.0 \pm 0.
C3H	3.0 \pm 0.9	1.1 \pm 0.1	16.0 \pm 1.9	1.0 \pm 2.
Positifs	2/3	-	1/3	-
BALB/c	2.7 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2	40.0 \pm 5.0	24.0 \pm 3.
BALB/c	23.6 \pm 4.3	3.0 \pm 0.3	15.0 \pm 4.4	8.0 \pm 1.
BALB/c	33.7 \pm 7.2	5.9 \pm 0.3	16.0 \pm 1.5	10.0 \pm 4.
Positifs	2/3	-	3/3	-

pGEX-NN : antigène de *P. falciparum* non cross-réactif avec His₆-747.

Les résultats positifs sont en gras.

5

**Tableau 3.1b: Stimulation de proliférations cellulaires et de sécrétion
d'IFN- γ par His₆-772 après 3 immunisations avec pNAK772.**

souche de souris	Prolifération lymphocytaire Index de stimulation		Interféron gamma IU/ml	
	His ₆ -772	pGEX- NN	His ₆ -772	pGEX- NN
C3H	0.9 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	23.9 \pm 2.0	10.7 \pm 2.
C3H	0.9 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1	1.7 \pm 2.0	3.3 \pm 2.
C3H	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	6.6 \pm 0.1	5.8 \pm 2.6
Positifs	0/3	-	1/3	-
BALB/c	3.5 \pm 0.3	2.7 \pm 0.4	24.0 \pm 2.2	10.8 \pm 3.
BALB/c	1.9 \pm 0.3	1.2 \pm 0.4	31.3 \pm 7.1	5.6 \pm 0.9
BALB/c	3.2 \pm 0.9	1.5 \pm 0.2	25.0 \pm 12.1	6.9 \pm 1.5
Positifs	1/3	-	3/3	-

pGEX-NN : antigène de *P. falciparum* non cross-réactif avec His₆-772.

Les résultats positifs sont en gras

10

Tableau 4.1: Réponses cellulaires de souris après 5 immunisations avec pNAK438*.

souris	Prolifération (I.S.)	Sécrétion d'IFN- γ	Anticorps
C3H	2.3 ± 0.3	2.2 ± 2.0	-
C3H	1.8 ± 1.1	15.6 ± 4.0	-
C3H	3.2 ± 1.3	0.5 ± 0.2	-
Positifs	2/3	1/3	
BALB/c	4.3 ± 1.6	26.2 ± 6.3	-
BALB/c	5.3 ± 0.6	29.3 ± 8.5	-
BALB/c	15.3 ± 2.2	12.7 ± 8.7	-
Positifs	3/3	3/3	

* Les taux de réponses sont représentés par rapport aux réponses obtenues par une valeur seuil. La valeur seuil est calculée en faisant la moyenne des réponses d'animaux non-immunisés et celle des animaux immunisés contre un antigène non-relevant, comme l'OspC, une protéine de la *Borrelia burgdorferi*.

Tableau 4.2: Détection d'expression par IFI avec des anticorps humains immunopurifiés ou des sérums de souris spécifiques anti-His₆-680

Parasites*	a-His ₆ -680 souris ou humains
Sporozoïtes <i>P. falciparum</i> NF54	++
Sporozoïtes <i>P. yoelii</i> clone 1.1	++
Stade hépatique <i>P. falciparum</i>	++
Stade sanguin T23	++/+++ (75%)
anneaux/schizontes	++/+++ (75%)
Stade sanguin NF54	
anneaux/schizontes	

* Les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum* viennent de la souche NF54. T23: souche de provenance thaï; NF54 souche d'origine africaine.

Tableau 5.1: Réactivités croisées détectées en Western blots entre les membres de la famille Pf11-1

	P43	P263	P322	P453	P525	P563	P571
E43							
E263							
E322							
E453							
E525							
E563							
E571							
E676f							
E571							



Réaction forte

Réaction moyenne

E : anticorps immunopurifiés (élués) sur les protéines recombinantes correspondantes.

5 P : protéine recombinante.

Tableau 5.2: Réactivités croisées au niveau nucléotidique entre les clones de la famille Pf11-1*

clones PM	PCR571 (1)	sonde contrôle
43	+++	++
88	++	0
322	+++++	+++++
525	++++	+++++
563	++++	++++
571	+++++	+++++
676f	+++++	++++
729E	+++	+++++
263	++++	NT
381	++	NT
453	+++	NT

10 * L'intensité du signal est symbolisé par des croix.

NT : non testé.

Tableau 5.3 : Homologies de séquences des clones étudiés par BLAST

Clone	Taille nucléotidique ¹ (bp)	Répétitions acides aminés	Homologie Nucléotides Protéines	Degré d'homologie avec 571 Nucléotides Protéines
DG43	<u>900</u>	PIVeELLEE	Pf11-1 Part 1 :94 %, 100% (=88)	80%, 80%
DG88	<u>900</u>	PIVeELLEE	Pf11-1 Part 1 :94 %, 100% (=43)	Idem DG43
DG263-7	253	Non	<i>P. falciparum</i> Chr 12 95%, 60%	-
DG263-8	176	Non	<i>P. f.</i> CHR12 95%, 45% humain chr22 58%	-
DG322-1	<u>500</u>	-	-	-
DG322-2	<u>2000</u>	PeeVLEEVI	Pf11-1 86 %, 65%	79% -
DG381	<u>400</u>	PEklvEEVI	plastid tRNA 100%, CHR2 71%	-
DG453	<u>300</u>	PIVEEvVEE	Pf11-1 Part 2 88%, 83%	93%, 72%
DG525	<u>450</u>	PeleEVEVI	GLURP R2 98%, 100%	-
DG563	438	PIVEEvVEE	Pf11-1 Part 4 : 86%, Part 1 68%	75%, 56%,
DG571	<u>550</u>	PEEIIEEIV	Pf11-1 Part 5 87 %, 55%	100 %, 100%
DG676f	2000	PvVEEvLEE	Pf11.1 Part 488 %, Part 5 75%	74%, 44%
DG729E	<u>1.7</u>	-	mal3P5 100%	-

1 : Taille estimée par rapport aux produits PCR obtenus, ou la taille précise lorsque le clone entier a été séquencé.

CHR : Chromosome; **part** : partie

Tableau 5.4: Réactivité en IFI testés avec des anticorps spécifiques aux His₆-571 et Vi571

Parasites	a-His ₆ -571, aVi571 souris ou humains
Sporozoïtes <i>P. falciparum</i> NF54	++
Sporozoïtes <i>P. yoelii</i> clone 1.1	++
Stade hépatique <i>P. falciparum</i>	++
Stade sanguin T23 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)
Stade sanguin NF54 anneaux/schizontes	++/+++ (75%)

Tableau 5.5: Réponses cellulaires des souris immunisées avec pNAK571

souche de souris	Prolifération lymphocytaire Index de stimulation		Interféron gamma IU/ml	
	571 pGEX	NNpGEX	571 pGEX	NNpGEX
C3H morte	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.05	31.0 ± 2.5	21.21 ± 10.6
C3H	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	30.2 ± 2.6	10.50 ± 2.03
C3H	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	16.8 ± 0.1	6.65 ± 2.8
Positifs	0/3	-	2/3	-
BALB/c	3.5 ± 0.3	2.7 ± 0.13	23.1 ± 0.9	10.36 ± 2.2
BALB/c	1.9 ± 0.3	1.2 ± 0.1	15.9 ± 2.1	8.63 ± 3.9
BALB/c (morte)	3.2 ± 0.9	1.5 ± 0.1	5.3 ± 1.3	1.06 ± 0.5
Positifs	2/3	-	3/3	-

NNpGEX : recombinant de fusion GST de LSA3 non relevant.

5

Bien que la présente invention ait été décrite par rapport aux réalisations concrètes et privilégiée, il apparaîtra toutefois évident aux personnes versées dans l'art ou la science en cause qu'il est possible d'introduire un certains nombres de variations et modifications sans déroger à la portée de l'invention décrite et revendiquée dans ce document.

10

REVENDICATIONS:

1. Polynucléotide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique ayant au moins 60 %, préférablement au moins 80% et
5 plus préférablement au moins 95% d'identité avec la SEQ ID NO: 1 (DG747) ou la SEQ ID NO: 2 (DG772).
2. Polynucléotide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il comprend au moins 10 nucléotides consécutifs identiques à la SEQ ID NO: 1 ou la SEQ ID NO: 2.
10
3. Polynucléotide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il s'hybride dans des conditions de fortes stringences avec un polynucléotide selon la revendication 1 ou la revendication 2.
- 15 4. Polypeptide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il est codé par un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
5. Polypeptide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il présente au moins 60%, préférablement au moins 80% et plus préférablement au moins 95% d'homologie
20 avec la SEQ ID NO: 3 (DG747) ou la SEQ ID NO: 4 (DG772).
6. Polypeptide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il comprend au moins 5 acides aminés consécutifs identiques à l'une des séquences choisies dans le groupe constitué par les SEQ ID NOs: 3 à 7, et la SEQ ID NO: 8.
25
7. Polypeptide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il présente au moins 40%, préférablement au moins 60%, plus préférablement au moins 80% et encore plus préférablement au moins 95% d'identité avec l'une des séquences choisies dans le groupe constitué par les SEQ ID NOs: 3 à 8, 10 et la SEQ ID NO: 12.
30
8. Polypeptide recombinant ou chimérique caractérisé en ce qu'il comprend au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 4 à 7.

9. Antigène isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il consiste en un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou en un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 4 à 8.

5

10. Conjugué antigénique constitué de polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, et/ou de polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8; et d'un support sur lequel lesdits polynucléotides/polypeptides sont adsorbés.

10

11. Conjugué selon la revendication 10 caractérisé en ce que le support est constitué de microsphères, de microparticules de billes de latex, de microparticules de polyphosphoglycans (PGLA) ou de microparticules de polystyrène.

15

12. Utilisation d'un conjugué selon la revendications 10 ou 11, pour l'immunisation d'individus infectés ou susceptibles d'être infectés par le paludisme.

20 13. Anticorps monoclonaux ou polyclonaux reconnaissants spécifiquement au moins un des polynucléotides, polypeptides et/ou conjugués définis aux revendications 1 à 11.

25 14. Anticorps selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'ils sont humanisés.

15. Vecteur de clonage ou d'expression comprenant une séquence polynucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

30 16. Un vecteur selon la revendication 15, dans lequel la dite séquence polynucléotidique est incorporé dans un site non essentiel à la réplication dudit vecteur.

17. Un vecteur selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce que ledit vecteur est choisi dans le groupe constitué par les plasmides, les cosmides et les phages.

5

18. Cellule hôte comprenant un vecteur selon l'une quelconque des revendications 15 à 18.

19. Cellule *E.Coli* recombinante choisie parmi les cellules déposées à la C.N.C.M. le 23 Mai 2001 sous les numéros d'accèsion I-2671 et I-2672.

10

20. Composition immunogène comprenant:

- au moins un des éléments suivants: des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, des conjugués selon la revendication 10 ou 11; et
- un véhicule pharmaceutique acceptable.

15

21. Composition immunogène selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle contient de plus au moins un composé choisi dans le groupe constitué par l'alun, le QS21, le montanide, l'adjuvant SBAS₂ et l'adjuvant incomplet de Freund.

20

22. Composition immunogène selon la revendication 20 ou 21, caractérisée en la molécule polypeptidique est adsorbé sur des microparticules.

25

23. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, dans laquelle ladite molécule polynucléotidique est sous forme d'ADN.

24. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 23 caractérisée en ce qu'elle comprend de plus au moins un épitope choisi dans le groupe constitué par: les protéines CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.

30

25. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 24 caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention d'une réponse cellulaire et/ou humorale *in vivo* et/ou *in vitro*.

5

26. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 25, caractérisée en ce qu'elle permet la production d'interféron- γ par des leucocytes de sujets immunisés par des sporozoïtes irradiés.

10 27. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 26, caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention d'une réponse humorale IgG.

15 28. Composition immunogène selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'elle permet l'obtention de réponse humorale de type IgG1, IgG2, IgG3 et/ou IgG4.

20 29. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 20 à 28, caractérisée en ce qu'elle est capable d'induire, *in vivo* et *in vitro*, une protection par une infection d'épreuve par *Plasmodium falciparum*.

20

30. Vaccin anti-palustre comprenant:

- au moins un des éléments suivants: des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, des conjugués selon la
- 25 revendication 10 ou 11; et
- un véhicule pharmaceutique acceptable.

25

31. Vaccin selon la revendication 30, caractérisé en ce qu'il comprend de plus au moins un épitope choisi dans le groupe constitué par: les protéines CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.

30

32. Composition pharmaceutique comportant à titre de substance active un ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux selon la revendication 13 ou 14, en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable.
- 5 33. Composition pharmaceutique selon la revendication 32, caractérisée en ce qu'elle comprend de plus au moins un composé choisi dans le groupe constitué par l'alun, le QS21, le montanide, l'adjuvant SBAS₂ et l'adjuvant incomplet de Freund.
- 10 34. Utilisation d'au moins un des éléments suivants: polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, conjugués selon la revendication 10 ou 11; anticorps selon la revendication 13 ou 14; pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du paludisme.
- 15 35. Méthode de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* comprenant les étapes suivantes :
- 20 a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu et/ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec un anticorps selon la revendication 13 ou 14 afin de permettre la formation de complexes immuns; et
- b) la détection *in vitro* des complexes immuns formés.
- 25 36. Méthode de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* comprenant les étapes suivantes :
- 30 a) la mise en contact, dans des conditions permettant une réaction immunologique, d'un tissu et/ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par *Plasmodium falciparum* avec au moins un des éléments suivants: des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3; des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, des conjugués selon la

revendication 10 ou 11; afin de permettre la formation de complexes immuns impliquant au moins un desdits éléments et des anticorps éventuellement présents dans ledit tissu ou ledit fluide biologique; et

b) la détection *in vitro* des complexes immuns éventuellement formés.

5

37. Méthode selon la revendication 35 ou 36, caractérisée en ce qu'à l'étape a), le tissu et/ou le fluide biologique est de plus mis en contact avec au moins un épitope choisi dans le groupe constitué par: les protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II ou LSA-3.

10

38. Kit pour le diagnostic *in vitro* du paludisme comprenant les éléments suivants :

a) au moins un des éléments choisi dans le groupe constitué par: les polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3; les polypeptides selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, les conjugués selon la revendication 10 ou 11;

15

b) des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins une des éléments définis en a); et

20

c) des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur susceptible d'être reconnu par un second réactif marqué.

39. Kit pour le diagnostic *in vitro* du paludisme comprenant les éléments suivants :

25

- des anticorps selon la revendication 13 ou 14;
- des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à une réaction de liaison entre un échantillon à tester et au moins un desdits anticorps; et
- des réactifs permettant la détection de complexes antigènes-anticorps produits par ladite réaction de liaison, ces réactifs pouvant également porter un marqueur susceptible d'être reconnu par un second réactif marqué.

30

62

40. Le kit pour le diagnostic *in vitro* du paludisme selon la revendication 38 ou 39, caractérisé en ce qu'il comprend de plus au moins une molécule peptidique choisie dans le groupe constitué par: les protéine CS, MSP-1, MSP-3, LSA-1, TRAP, STARP, SALSA, SALSA I, SALSA II et LSA-3.

5

41. Kit pour le diagnostic *in vitro* du paludisme selon l'une quelconque des revendications 38 à 40, caractérisé en ce qu'il comprend également l'adjuvant SBAS2.

1/28

FIGURE 1A: SEQ ID NO 1 (DG747)

1 GAATTCCATA TGCACGATTA CATATATGAT GATCGTATCT ACAATAATGA TAAAGAGAAA
61 AATGTTATAA AAAGTGATAA TAAAAATGTT ATAAAAAGTG ATAATAAAAA TGATTATAAA
121 AAGTGTAAATA AAAATGTTAT AAAAAGTGAT AATAAAAATG TTATAAAAAG TGATAATAAA
181 AATGTGGAAT TC

FIGURE 1B: SEQ ID NO 2 (DG772)

1 GAATCCCAG ATCCTCGAAG TAATGACCAA GAAGATGCTA CTGACGATGT TG TAGAAAAT
61 AGTAGAGATG ATAATAATAG TCTCTCTAAT AGCGTAGATA ATCAAAGTAA TGTTTTAAAT
121 AGAGAAGATC CTATTGCTTC TGAAACTGAA GTTGTAAGTG AACCTGAGGA TTCAAGTAGG
181 ATAATGACTA CAGAAGTTCC AAGTACTACT GTAAAACCCC CTGATGAAAA ACGATCTGAA
241 GAAGTAGGAG AAAAAGAAGC TAAAGAAATT AAAGTAGAAC CTGTTGTACC AAGAGCCATT
301 GGAGAACCAA TGGAAAATTC TGTGAGCGTA CAGTCCCCTC CTAAGGAATT C

FIGURE 1C: SEQ ID NO 3 (DG747)

1 EFHMDYIYD DRIYNNDEK NVIKSDKNV IKSDNKNDYK KCNKNVIKSD NKNVIKSDNK
61 NVEF

FIGURE 1D: SEQ ID NO 4 (DG772)

1 EFPDPRSNDQ EDATDDVVEN SRDDNNSLSN SVDNQSNVLN REDPIASETE VVSEPEDSSR
61 IMTTEVPSTT VKPPDEKRSE EVGEKEAKEI KVEPVVPRAI GEPMENSVSQ QSPPKF

FIGURE 1E: SEQ ID NOs 5-8:

SEQ ID NO 5: DNKNV

SEQ ID NO 6: DNKND

SEQ ID NO 7: DKEKNV

SEQ ID NO 8: KSDNKNV

FIGURE 2A:

BNSDOCID: <WO_____02092628A2_I_>

FIGURE 2A (suite)

BNSDOCID: <WO_____02092628A2 | >

4/28

FIGURE 2A (suite)

710 720 730 740 750 760 770 780
| | | | | | | |
AAGAAAAATATAGCCAATGAAAATATAAAGAAGGAAAGAGTTCAATTTATAATGATGAACATAATTATAATTCATTA
K K N I A N E N I K E G K S S I Y N D E H N Y N S L
R K I . P M K I . K K E R V Q F I M M N I I I I H Y
E K Y S Q . K Y K R R K E F N L . . . T . L . F I I

790 800 810 820 830 840 850
| | | | | | | |
TTATATAATTCTTGTAATGGTGAAATAAGTAAGATCAACAAAATAAGTAGTCATAATAATATTGATAATAATATGGAT
L Y N S C N G E I S K I N K I S S H N N I D N N M D
Y I I L V M V K . V R S T K . V V I I I L I I I W I
I . F L . W . N K . D Q Q N K . S . . Y . . . Y G .

860 870 880 890 900 910 920 930
| | | | | | | |
AATTATAATACGTTTGCAAATGTGAATAATTTTATAATATATTCCTCAGATGATGAAGATAATATATCAAATTATTAT
N Y N T F A N V N N F I I Y S S D D E D N I S N Y Y
I I I R L Q M . I I L . Y I P Q M M K I I Y Q I I I
L . Y V C K C E . F Y N I F L R . . R . Y I K L L .

940 950 960 970 980 990 1000 1010
| | | | | | | |
AATGGTAAAGACGTATTAAATGATGAGATTATGTTCCCTATAAAATTTAATTTTGAAAAATTAAAAAAAATATTTAT
N G K D V L N D E I M F P I K F N F E K L K K N I Y
M V K T Y . M M R L C S L . N L I L K N . K K I F M
W . R R I K . . D Y V P Y K I . F . K I K K K Y L C

5/28

FIGURE 2A (suite)

1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090
GTAATAGAGCATATAGACAAAATATATTATGATACATTTTTAAATAAAAAATCCAAGTGAAAAAAGTGTTCATGAAT							
<u>V I E H I D K I Y Y D T F L N K N P S E K S V F M N</u>							
• • S I • T K Y I M I H F • I K I Q V K K V F L • M							
N R A Y R Q N I L • Y I F K • K S K • K K C F Y E •							
1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
GATGAATCTACTGTTATTTGAAAAATGATGTGAATGACAAATGTGTTGTTGATAATATAAATGTTATTAATCCTTCT							
<u>D E S T G Y L K N D V N D K C V V D N I N V I N P S</u>							
M N L L V I • K M M • M T N V L L I I • M L L I L L							
• I Y W L F E K • C E • Q M C C • • Y K C Y • S F •							
1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	
AGTGTGAATACGTTGAGTAATATTTCAAATATTAGGAATGAAAAATAGAAAATAATAATAAGAATGAAAAATTAATA							
<u>S V N T L S N I S N I R N E K I E N N N K N E K L I</u>							
V • I R • V I F Q I L G M K K • K I I I R M K N • •							
C E Y V E • Y F K Y • E • K N R K • • • E • K I N K							
1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
AAATCATATCCTACACAATCAAAAAATGTTATGAGTACATTTTCCTTTTGAATATTGAAAAGGAGACATTTATAACA							
<u>K S Y P T Q S K N V M S T F S F W N I E K E T F I T</u>							
N H I L H N Q K M L • V H F P F G I L K R R H L • Q							
I I S Y T I K K C Y E Y I F L L E Y • K G D I Y N K							
1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
AAACCTTTGTATGCACAAAATTTGAGAAAAAACAATTTAGTTTATTAGATGAATCTGAAGAGATGATAAGAAATTAT							
<u>K P L Y A Q N L R K K Q F S L L D E S E E M I R N Y</u>							
N L C M H K I • E K N N L V Y • M N L K R • • E I I							
T F V C T K F E K K T I • F I R • I • R D D K K L F							

6/28

FIGURE 2A (suite)

1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480
TCATCTAATCAATATTCTATAAAATTTGTACCAAGACATTTATTATATGTAATGAGTCAAGTTGCTTCTCGATCCTTT							
<u>S S N Q Y S I K F V P R H L L Y V M S Q V A S R S F</u>							
H L I N I L . N L Y Q D I Y Y M . . V K L L L D P F							
I . S I F Y K I C T K T F I I C N E S S C F S I L F							
:							
1490	1500	1510	1520				
TTTGATCCTTTATATAGAAAGCAGTTATTTTTTCGTTACTAA							
<u>F D P L Y R K Q L F F R Y .</u>							
L I L Y I E S S Y F F V T							
. S F I . K A V I F S L L							

7/28

Figure 2B:

10 20 30 40 50 60 70
| | | | | | |
ATGAAAGGGAAAATGAATATGTGTTTGTCTTTCTATTCTATATTATATGTTGTATTATGTACCTATGTATTAGGT
M K G K M N M C L F F F Y S I L Y V V L C T Y V L G
• K G K • I C V C F F S I L Y Y M L Y Y V P M Y • V
E R E N E Y V F V F F L F Y I I C C I M Y L C I R Y

80 90 100 110 120 130 140 150
| | | | | | |
ATAAGTGAAGAGTATTTGAAGGAAAGGCCCAAGGTTTAAATGTTGAGACTAATAATAATAATAATAATAATAAT
I S E E Y L K E R P Q G L N V E T N N N N N N N N
• V K S I • R K G P K V • M L R L I I I I I I I I I
K • R V F E G K A P R F K C • D • • • • • • • • •

160 170 180 190 200 210 220 230
| | | | | | |
AATAATAGTAATAGTAACGATGCGATGTCTTTTGTAATGAAGTAATAAGGTTTATAGAAAACGAGAAGGATGATAAA
N N S N S N D A M S F V N E V I R F I E N E K D D K
I I V I V T M R C L L • M K • • G L • K T R R M J K
• • • • R C D V F C K • S N K V Y R K R E G • • R

240 250 260 270 280 290 300 310
| | | | | | |
GAAGATAAAAAAGTGAAGATAATATCTAGACCTGTTGAGAATACATTACATAGATATCCAGTTAGTTCTTTTCTGAAT
E D K K V K I I S R P V E N T L H R Y P V S S F L N
K I K K • R • Y L D L L R I H Y I D I Q L V L F • I
R • K S E D N I • T C • E Y I T • I S S • F F S E Y

8/28

FIGURE 2B (suite)

320	330	340	350	360	370	380	390
ATCAAAAAGTATGGTAGGAAAGGGGAATATTTGAATAGAAATAGTTTTGTTCAAAGATCATATATAAGGGGTTGTAAA							
<u>I K K Y G R K G E Y L N R N S F V Q R S Y I R G C K</u>							
S K S M V G K G N I . I E I V L F K D H I . G V V K							
Q K V W . E R G I F E . K . F C S K I I Y K G L . R							
400	410	420	430	440	450	460	
GGAAAAAGAAGCACACATACATGGATATGTGAAAATAAAGGGAATAATAATATATGTATTCTGATAGACGTGTACAA							
<u>G K R S T H T W I C E N K G N N N I C I P D R R V Q</u>							
E K E A H I H G Y V K I K G I I I Y V F L I D V Y N							
K K K H T Y M D M . K . R E . . Y M Y S . . T C T I							
470	480	490	500	510	520	530	540
TTATGTATAACAGCTCTTCAAGATTTAAAAAATTCAGGATCTGAAACGACTGATAGAAAATTATTAAGAGATAAAGTA							
<u>L C I T A L Q D L K N S G S E T T D R K L L R D K V</u>							
Y V . Q L F K I . K I Q D L K R L I E N Y . E I K Y							
M Y N S S S R F K K F R I . N D . . K I I K R . S I							
550	560	570	580	590	600	610	620
TTTGATTTCAGCTATGTATGAAACTGATTTGTTATGGAATAAATATGGTTTTCTGGATTTGATGATTTTGTGACGAT							
<u>F D S A M Y E T D L L W N K Y G F R G F D D F C D D</u>							
L I Q L C M K L I C Y G I N M V F V D L M I F V T M							
. F S Y V . N . F V M E . I W F S W I . . F L . R C							
630	640	650	660	670	680	690	700
GTAAAAAATAGTTATTTAGATTATAAAGATGTTATATTTGGAACCGATTTAGATAAAAAATAATATATCAAAGTTAGTA							
<u>V K N S Y L D Y K D V I F G T D L D K N N I S K L V</u>							
. K I V I . I I K M L Y L E P I . I K I I Y Q S . .							
K K . L F R L . R C Y I W N R F R . K . Y I K V S R							

9/28

FIGURE 2B (suite)

710	720	730	740	750	760	770	780
GAGGAATCATTAAACGTTTTTTTAAAAAGATAGTAGTGTACTTAATCCTACTGCTTGGTGGAGAAGGTATGGAACA							
<u>E E S L K R F F K K D S S V L N P T A W W R R Y G T</u>							
R N H . N V F L K K I V V Y L I L L L G G E G M E Q							
G I I K T F F . K R . . C T . S Y C L V E K V W N K							
790	800	810	820	830	840	850	
AGACTATGAAAACTATGATACAGCCATATGCTCATTTAGGATGTAGAAAACCTGATGAGAATGAACCTCAGATAAAT							
<u>R L W K T M I Q P Y A H L G C R K P D E N E P Q I N</u>							
D Y G K L . Y S H M L I . D V E N L M R M N L R . I							
T M E N Y D T A I C S F R M . K T . . E . T S D K .							
860	870	880	890	900	910	920	930
AGATGGATTCTGGAATGGGGGAAATATAATTGTAGATTAATGAAGGAGAAAGAAAAATTGTTAACAGGAGAATGTTCT							
<u>R W I L E W G K Y N C R L M K E K E K L L T G E C S</u>							
D G F W N G G N I I V D . . R R K K N C . Q E N V L							
M D S G M G E I . L . I N E G E R K I V N R R M F C							
940	950	960	970	980	990	1000	1010
GTTAATAGAAAAAATCTGACTGCTCAACCGGATGTAATAATGAGTGTATACCTATAGGAGTCTTATTAATAGACAA							
<u>V N R K K S D C S T G C N N E C Y T Y R S L I N R Q</u>							
L I E K N L T A Q P D V I M S V I P I G V L L I D K							
. . K K I . L L N R M . . . V L Y L . E S Y . . T K							
1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090
AGATATGAGGTCTCTATATTAGGAAAAAATATATTAAAGTAGTACGATATACTATATTTAGGAGAAAAATAGTTCAA							
<u>R Y E V S I L G K K Y I K V V R Y T I F R R K I V Q</u>							
D M R S L Y . E K N I L K . Y D I L Y L G E K . F N							
I . G L Y I R K K I Y . S S T I Y Y I . E K N S S T							

10/28

FIGURE 2B (suite)

1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
CCTGATAATGCTTTGGATTTTTTAAAATTAAATTGTTCTGAGTGTAAGGATATTGATTTTAAACCCTTTTTTGAATTT							
<u>P D N A L D F L K L N C S E C K D I D F K P F F E F</u>							
L I M L W I F . N . I V L S V R I L I L N P F L N L							
. . C F G F F K I K L F . V . G Y . F . T L F . I .							
1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	
GAATATGGTAAATATGAAGAAAAATGTATGTGTCAATCATATATTGATTTAAAAATCCAATTTAAAAATAATGATATT							
<u>E Y G K Y E E K C M C Q S Y I D L K I Q F K N N D I</u>							
N M V N M K K N V C V N H I L I . K S N L K I M I F							
I W . I . R K M Y V S I I Y . F K N P I . K . . Y L							
1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
TGTTTCATTTAATGCTCAAACAGATACTGTTTCTAGCGATAAAAGATTTTGTCTTGAAAAGAAAGAATTTAAACCATGG							
<u>C S F N A Q T D T V S S D K R F C L E K K E F K P W</u>							
V H L M L K Q I L F L A I K D F V L K R K N L N H G							
F I . C S N R Y C F . R . K I L S . K E R I . T M E							
1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
AAATGTGATAAAAATTCTTTTGAAACAGTTCATCATAAAGGTGTATGTGTGTCCCGAGAAGACAAGGTTTTTGTTTA							
<u>K C D K N S F E T V H H K G V C V S P R R Q G F C L</u>							
N V I K I L L K Q F I I K V Y V C H R E D K V F V .							
M . . K F F . N S S S . R C M C V T E K T R F L F R							
1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480
GGAAATTTGAACTATCTACTGAATGATGATATTTATAATGTACATAATTCACAACTACTTATCGAAATTATAATGGCT							
<u>G N L N Y L L N D D I Y N V H N S Q L L I E I I M A</u>							
E I . T I Y . M M I F I M Y I I H N Y L S K L . W L							
K F E L S T E . . Y L . C T . F T T T Y R N Y N G F							

11/28

FIGURE 2B (suite)

1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
TCTAAACAAGAAGGAAAGTTATTATGGAAAAACATGGAACAATACTTGATAACCAGAATGCATGCAAATATATAAAT							
<u>S K Q E G K L L W K K H G T I L D N Q N A C K Y I N</u>							
L N K K E S Y Y G K N M E Q Y L I T R M H A N I . M							
. T R R K V I M E K T W N N T . . P E C M Q I Y K .							
1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	
GATAGTTATGTTGATTATAAAGATATAGTTATTGGAAATGATTTATGGAATGATAACAACCTCTATAAAAGTTCAAAT							
<u>D S Y V D Y K D I V I G N D L W N D N N S I K V Q N</u>							
I V M L I I K I . L L E M I Y G M I T T L . K F K I							
. L C . L . R Y S Y W K . F M E . . Q L Y K S S K .							
1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	1710
AATTTAAATTTAATTTTGAAGAAATTTTGGTTATAAAGTTGGAAGAAATAAACTCTTTAAACAATTAAGAATTA							
<u>N L N L I F E R N F G Y K V G R N K L F K T I K E L</u>							
I . I . F L K E I L V I K L E E I N S L K Q L K N .							
F K F N F . K K F W L . S W K K . T L . N N . R I K							
1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790
AAAAATGTATGGTGGATATTAATAGAAATAAAGTATGGGAATCAATGAGATGTGGAATTGACGAAGTAGATCAACGT							
<u>K N V W W I L N R N K V W E S M R C G I D E V D Q R</u>							
K M Y G G Y . I E I K Y G N Q . D V E L T K . I N V							
K C M V D I K . K . S M G I N E M W N . R S R S T .							
1800	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870
AGAAAACTTGTGAAAGAATAGATGAAGTAGAAACATGCCACAATTCTTTAGATGGTTTTTCACAATGGGCACATTC							
<u>R K T C E R I D E L E N M P Q F F R W F S Q W A H F</u>							
E K L V K E . M N . K T C H N S L D G F H N G H I S							
K N L . K N R . T R K H A T I L . M V F T M G T F L							

12/28

FIGURE 2B (suite)

1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
TTTTGTAAGGAAAAAGAATATTGGGAATTAAAATTAAATGATAAATGTACAGGTAATAATGGAAAATCCTTATGTCAG							
<u>F C K E K E Y W E L K L N D K C T G N N G K S L C Q</u>							
F V R K K N I G N . N . M I N V Q V I M E N P Y V R							
L . G K R I L G I K I K . . M Y R . . W K I L M S G							
1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	
GATAAAACATGTCAAATGTGTGTACTAATATGAATTATTGGACATATACTAGAAAATTAGCTTATGAAATACAATCC							
<u>D K T C Q N V C T N M N Y W T Y T R K L A Y E I Q S</u>							
I K H V K M C V L I . I I G H I L E N . L M K Y N P							
. N M S K C V Y . Y E L L D I Y . K I S L . N T I R							
2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
GTAAATATGATAAAGATAGAAAATTATTTAGTCTTGCTAAAGACAAAATGTAACACTACATTTTAAAGGAAAATGCA							
<u>V K Y D K D R K L F S L A K D K N V T T F L K E N A</u>							
. N M I K I E N Y L V L L K T K M . L H F . R K M Q							
K I . . R . K I I . S C . R Q K C N Y I F K G K C K							
2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180
AAAAATTGTTCTAATATAGATTTTACAAAAATATTTCGATCAGCTTGACAAACTCTTTAAGGAAAGATGTTTCATGTATG							
<u>K N C S N I D F T K I F D Q L D K L F K E R C S C M</u>							
K I V L I . I L Q K Y S I S L T N S L R K D V H V W							
K L F . Y R F Y K N I R S A . Q T L . G K M F M Y G							
2190	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2260
GATACACAAGTTTTAGAAGTAAAAACAAAGAAATGTTATCTATAGACTCAAATAGTGAAGATGCGACAGATATAAGT							
<u>D T Q V L E V K N K E M L S I D S N S E D A T D I S</u>							
I H K F . K . K T K K C Y L . T Q I V K M R Q I . V							
Y T S F R S K K Q R N V I Y R L K . . R C D R Y K .							

13/28

FIGURE 2B (suite)

2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340
GAGAAAAATGGAGAGGAAGAATTATATGTAAATCACAAATCTGTGAGTGTGCGCAAGTGGTAATAAAGAAATCGAAAAG							
<u>E K N G E E E L Y V N H N S V S V A S G N K E I E K</u>							
R K M E R K N Y M . I T I L . V S Q V V I K K S K R							
E K W R G R I I C K S Q F C E C R K W . . R N R K E							
2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	
AGTAAGGATGAAAAGCAACCTGAAAAAGAAGCAAAACAACTAATGGAACCTTTAACCGTACGAACTGACAAAGATTCA							
<u>S K D E K Q P E K E A K Q T N G T L T V R T D K D S</u>							
V R M K S N L K K K Q N K L M E L . P Y E L T K I Q							
. G . K A T . K R S K T N . W N F N R T N . Q R F R							
2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490
GATAGAAACAAAGGAAAAGATACAGCTACTGATACAAAAAATTCACCTGAAAATTTAAAAGTACAGGAACATGGAACA							
<u>D R N K G K D T A T D T K N S P E N L K V Q E H G T</u>							
I E T K E K I Q L L I Q K I H L K I . K Y R N M E Q							
. K Q R K R Y S Y . Y K K F T . K F K S T G T W N K							
2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570
AATGGAGAAACAATAAAAGAAGAACCACCAAAATTACCTGAATCATCTGAAACATTACAATCACAAGAACAATTAGAA							
<u>N G E T I K E E P P K L P E S S E T L Q S Q E Q L E</u>							
M E K Q . K K N H Q N Y L N H L K H Y N H K N N . K							
W R N N K R R T T K I T . I I . N I T I T R T I R S							
2580	2590	2600	2610	2620	2630	2640	2650
GCAGAAGCACAAAAACAAGAAAGAAACCAAAAAAAAAACAAGAAAGAACCAAAAAAAAAACAAGAAAGAA							
<u>A E A Q K Q K Q E E E P K K K Q E E E P K K K Q E E</u>							
Q K H K N K N K K K N Q K K N K K K N Q K K N K K K							
R S T K T K T R R R T K K K T R R R T K K K T R R R							

14/28

FIGURE 2B (suite)

2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730
GAACAAAAACGAGAACAAGAACAACAAAAACAAGAACAAGAAGAACAACAAATACAA							
<u>E Q K R E Q E Q K Q E Q E E E Q K Q E E E Q Q I Q</u>							
N K N E N K N K N K K K K N K N K K K N N K Y K							
T K T R T R T K T R T R R R R T K T R R R T T N T R							

2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800
GATCAATCACAAAGTGGATTAGATCAATCCTCAAAAGTAGGAGTAGCGAGTGAACAAAATGAAATTTCTTCAGGACAA						
<u>D Q S Q S G L D Q S S K V G V A S E Q N E I S S G Q</u>						
I N H K V D . I N P Q K . E . R V N K M K F L Q D K						
S I T K W I R S I L K S R S S E . T K . N F F R T R						

2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880
GAACAAAACGTAAAAAGCTCTTCACCTGAAGTAGTTCACAAGAAACAACACTAGTGAAAATGGGTCATCACAAAGACACA							
<u>E Q N V K S S S P E V V P Q E T T S E N G S S Q D T</u>							
N K T . K A L H L K . F H K K Q L V K M G H H K T Q							
T K R K K L F T . S S S T R N N . . K W V I T R H K							

2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950	2960
AAAATATCAAGTACTGAACCAATGAGAATTCTGTTGTAGATAGAGCAACAGATAGTATGAATTTAGATCCTGAAAAG							
<u>K I S S T E P N E N S V V D R A T D S M N L D P E K</u>							
K Y Q V L N Q M R I L L . I E Q Q I V . I . I L K R							
N I K Y . T K . E F C C R . S N R . Y E F R S . K G							

2970	2980	2990	3000	3010	3020	3030	3040
GTTCATAATGAAAATATGAGTGATCCAAATACAAATACTGAACCAGATGCATCTTTAAAGATGATAAGAAGGAAGTT							
<u>V H N E N M S D P N T N T E P D A S L K D D K K E V</u>							
F I M K I . V I Q I Q I L N Q M H L . K M I R R K L							
S . . K Y E . S K Y K Y . T R C I F K R . . E G S .							

15/28

FIGURE 2B (suite)

3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110	3120
GATGATGCCAAAAAAGAACTTCAATCTACTGTATCAAGAATTGAATCTAATGAACAGGACGTTCAAAGTACACCACCC							
<u>D D A K K E L Q S T V S R I E S N E Q D V Q S T P P</u>							
M M P K K N F N L L Y Q E L N L M N R T F K V H H P							
. C Q K R T S I Y C I K N . I . . T G R S K Y T T R							
3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	
GAAGATACTCCTACTGTTGAAGGAAAAGTAGGAGATAAAGCAGAAATGTTAACTTCTCCGCATGCGACAGATAATTCT							
<u>E D T P T V E G K V G D K A E M L T S P H A T D N S</u>							
K I L L L L K E K . E I K Q K C . L L R M R Q I I L							
R Y S Y C . R K S R R . S R N V N F S A C D R . F .							
3200	3210	3220	3230	3240	3250	3260	3270
GAGTCGGAATCAGGTTTAAATCCAAGTATGACATTAACAAGTATGGTGTGTTAAAGAACAAGAAATATTAGGG							
<u>E S E S G L N P T D D I K T T D G V V K E Q E I L G</u>							
S R N Q V . I Q L M T L K Q L M V L L K N K K Y . G							
V G I R F K S N . . H . N N . W C C . R T R N I R G							
3280	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350
GGAGGTGAAAGTGCAACTGAAACATCAAAAAGTAATTTAGAAAAACCTAAGGATGTTGAACCTTCTCATGAAATATCT							
<u>G G E S A T E T S K S N L E K P K D V E P S H E I S</u>							
E V K V Q L K H Q K V I . K N L R M L N L L M K Y L							
R . K C N . N I K K . F R K T . G C . T F S . N I .							
3360	3370	3380	3390	3400	3410	3420	3430
GAACCTGTTCTTTCTGGTACAAGTGAAGAAGAATCAGAGTTATTAAAAAGTAAATCGATAGAGACGAAGGGGGA							
<u>E P V L S G T T G K E E S E L L K S K S I E T K G E</u>							
N L F F L V Q L V K K N Q S Y . K V N R . R R R G K							
T C S F W Y N W . R R I R V I K K . I D R D E G G N							

16/28

FIGURE 2B (suite)

3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510
 ACAGATCCCTCCAACTAATACGCTAGAGATGCTACTGACGATGTTCTGCAAAATAGTAGAGATGATAAATAAGTCTC
 TTD P R S I N D Q E D A T D D V V E N S P R I D D N N N S T U
 Q I L E V M T K K M L T L M L D L K R T V E E M L T L P C V S
 R I S B K L I P F R T R C Y P S W L C G R R K N S I L R E S I L T N S I
 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580
 TCTAATAGCTAGATAAATCAATAGTAACTTTTAAATAGAGATGATCTATGCTTCTTCAACTCAAGTCTTAACTGAT
 S N S V D N N O S N N W L N R E E D I E S T T A S S E P T E V V S L B
 L A T A N T I K K V M T E L L E S K L T D T D T E K L L K L L S V N
 R R P S S I C T E T O W E R S Y N S I L E S N I P S F C K N S T
 3590 3600 3610 3620 3630 3640 3650 3660
 CTTGAGGATTCAAGTAGGATAATCACTACAGAACTTCCAGTACCTACGTAATACCCCTGATGAAATACGATGTCAT
 P E R D S S S R T T L M T T T E V A N S S T T S V K S P P D E P K R S S E
 T R T T O V A G T S E L G K E P O V T T T S P A N S T E L M K N I D T D K
 T G L P K K S I D N I B V Y R S S E K T Y S I C T K S I T P L T A K R I T P K R
 3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740
 GAAGTAGCAGAAATGATCCAAAGAAATTAAGTAGAGCTCTCTGATCCTAGAGCCATLGGAGAACCAATGCAAAAT
 D T V A G D E K I F E T A K T S T K E V E D I P V V E P P T G A T T E G T D D P N M T E C N
 K T E L K K K L K K K K K K N L L T E Y S I E S P E T L E Y N T O W S K T E
 S R R K R S E S R R N S S R T T C T C T S I P S I P W I E R S I D N G P K S E
 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820
 ICTGTGAGCTGATAGCTGCTCTCTTAATGTAGAAGATGTTGAAAAAGAAACATTGATATCTGAGAATAATGGATTACAT
 S V S W L O S T P P N V E D V E K E T L I S E N N G L H
 L S A S S P T R T M K M L K K K H Y L R I M D Y I
 P E R T A S S S C R R C K R N I D I E W I T

17/28

FIGURE 2B (suite)

3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
| | | | | | | |
AATGATACACACAGAGGAAATATCAGTGAAAAGGATTTAATCGATATTCATTTGTTAAGAAATGAAGCGGGTAGTACA
N D T H R G N I S E K D L I D I H L L R N E A G S T
M I H T E E I S V K R I . S I F I C . E M K R V V Q
. Y T Q R K Y Q . K G F N R Y S F V K K . S G . Y N

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970
| | | | | | | |
ATATTAGATGATTCTAGAAGAAATGGAGAAATGACAGAAGGTAGCGAAAGTGATGTTGGAGAATTACAAGAACATAAT
I L D D S R R N G E M T E G S E S D V G E L Q E H N
Y . M I L E E M E K . Q K V A K V M L E N Y K N I I
I R . F . K K W R N D R R . R K . C W R I T R T . F

3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050
| | | | | | | |
TTTAGCACACAACAAAAAGATGAAAAAGATTTTGACCAAATTGCGAGCGATAGAGAAAAAGAAGAAATTCAAAAATTA
F S T Q Q K D E K D F D Q I A S D R E K E E I Q K L
L A H N K K M K K I L T K L R A I E K K K K F K N Y
. H T T K R . K R F . P N C E R . R K R R N S K I T

4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130
| | | | | | | |
CTTAATATAGGACATGAAGAGGATGAAGATGTATTAAAAATGGATAGAACAGAGGATAGTATGACTGATGGAGTTAAT
L N I G H E E D E D V L K M D R T E D S M S D G V N
L I . D M K R M K M Y . K W I E Q R I V . V M E L I
. Y R T . R G . R C I K N G . N R G . Y E . W S . .

4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210
| | | | | | | |
AGTCATTTGTATTATAATAATCTATCAAGTGAAGAAAAAATGGAACAATATAATAATAGAGATGCTTCTAAAGATAGA
S H L Y Y N N L S S E E K M E Q Y N N R D A S K D R
V I C I I I I Y Q V K K K W N N I I I E M L L K I E
S F V L . . S I K . R K N G T I . . . R C F . R . R

18/28

FIGURE 2B (suite)

4220	4230	4240	4250	4260	4270	4280	4290
GAAGAAATATTGAATAGGTCAAACACAAATACATGTTCTAATGAACATTCATTAAAATATTGTCAATATATGGAAAGA							
<u>E E I L N R S N T N T C S N E H S L K Y C Q Y M E R</u>							
K K Y . I G Q T Q I H V L M N I H . N I V N I W K E							
R N I E . V K H K Y M F . . T F I K I L S I Y G K K							
4300	4310	4320	4330	4340	4350	4360	
AATAAGGATTTATTAGAAACATGTTCTGAAGACAAAAGTTACATTTATGTTGTGAAATATCAGATTATTGTTTAAAA							
<u>N K D L L E T C S E D K R L H L C C E I S D Y C L K</u>							
I R I Y . K H V L K T K G Y I Y V V K Y Q I I V . N							
. G F I R N M F . R Q K V T F M L . N I R L L F K I							
4370	4380	4390	4400	4410	4420	4430	4440
TTTTTCAATCCTAAATCGATAGAATACTTTGATTGTACACAAAAAGAATTTGATGACCCTACATATAATTGTTTTAGA							
<u>F F N P K S I E Y F D C T Q K E F D D P T Y N C F R</u>							
F S I L N R . N T L I V H K K N L M T L H I I V L E							
F Q S . I D R I L . L Y T K R I . . P Y I . L F . K							
4450	4460	4470	4480	4490	4500	4510	4520
AAACAAAGATTTACAAGTATGTCATGTTATAAAATTA AAAACAATATACATTAATATGTTAATAAAAAAATAATATA							
<u>K Q R F T S M S C Y K I K N N I H . Y V N K K N N I</u>							
N K D L Q V C H V I K L K T I Y I N M L I K K I I Y							
T K I Y K Y V M L . N . K Q Y T L I C . . K K . Y I							
4530	4540	4550	4560	4570	4580	4590	4600
TTTTTTTCTCTTTTCTTTTTTTTAAATAGGTATGCATTATATTGCCGGGGTGGTATAATAGCCCTTTTATTGTTTA							
<u>F F S L F L F F . . V C I I L P G V V . . P F Y C L</u>							
F F L F F F F F N R Y A L Y C R G W Y N S P F I V Y							
<u>F F S F S F F L I G M H Y L A G G G I I A L L L F I</u>							

19/28

FIGURE 2B (suite)

4610	4620	4630	4640	4650	4660	4670	4680
TTTTAGGTTTCAGCCAGCTATAGGAAGAATTTGTAAGAAAAAAGGATGAAGAAATATAAACAAAAATATAAATATATG							
F . V Q P A I G R I C K K K R M K K Y K Q K Y K Y M							
F R F S Q L . E E F V R K K G . R N I N K N I N I C							
<u>L G S A S Y R K N L . E K K D E E I . T K I . I Y A</u>							
4690	4700	4710	4720	4730	4740	4750	
CATATATATTTAAGTATTATAAGAACATATATATAAATAAATATGTATATTTTATTATTATTATTATAGGGATGATGA							
H I Y L S I I R T Y I . I N M Y I F I L L L . G . .							
I Y I . V L . E H I Y K . I C I F L F Y Y Y R <u>D D E</u>							
Y I F K Y Y K N I Y I N K Y V Y F Y F I I I G M M K							
4760	4770	4780	4790	4800	4810	4820	4830
AAAAGGATTCTACGATTCTAATTTAAATGATTCTGCTTTTGAATATAATAATAATAAATATAATAAATTACCTTATAT							
K R I L R F . F K . F C F . I . . . I . . I T L Y							
<u>K G F Y D S N L N D S A F E Y N N N K Y N K L P Y M</u>							
K D S T I L I . M I L L L N I I I I N I I N Y L I C							
4840	4850	4860	4870	4880	4890	4900	4910
GTGTAAGGAAAAAATAAAAAACAAAAAATATATATATATATATATATATTTACGGATGCATTTCCACA							
V . G K N . K T K K K K N I Y I Y I Y I Y G C I S T							
C K E K T K K Q K K K K I Y I Y I Y I F T D A F E H							
V R K K L K N K K K K K Y I Y I Y I Y L R M H F H I							
4920	4930	4940	4950	4960	4970	4980	4990
TTCCTATTTCTTATTCTTATAATTTTATTATTTATTTATTTATTTTTCGTAGTTGATCAACAAATAAA							
F L L F L I L I I F I I Y L F I F F F R S . S T N K							
S Y Y F L F L . F L L F I Y L F F F F <u>V V D Q Q I N</u>							
P I I S Y S Y N F Y Y L F I Y F F F S . L I N K . M							

20/28

FIGURE 2B (suite)

5000	5010	5020	5030	5040	5050
TG TAGTAAATTCTGATTTATATTCGGAGGGTATTTATGATGACACAACGACATTTTAA					
C	S	K	F	•	F
I	F	G	G	Y	L
•	•				
V	V	N	S	D	L
Y	S	E	G	I	Y
D	D	T	T	T	F
•					
•	•	I	L	I	Y
I	R	R	V	F	M
M					

21 / 28

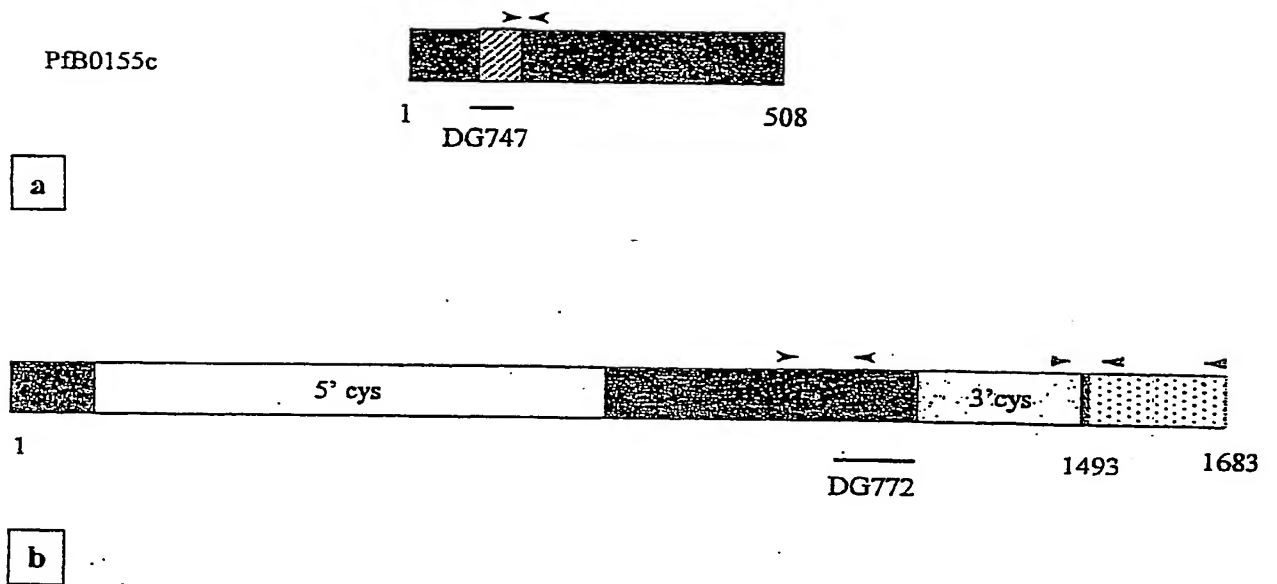


Figure 3.1

22 / 28

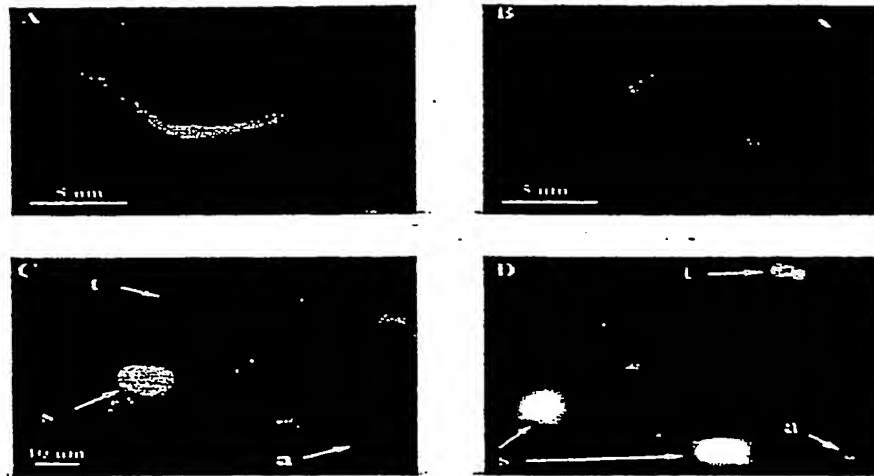
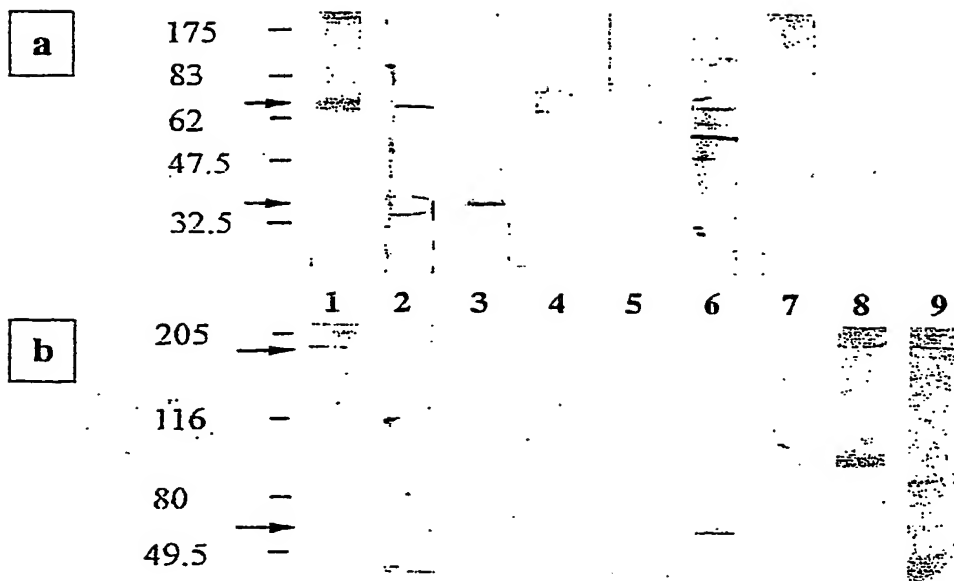


Figure 3.2

23 / 28

**Figure 3.3**

24 / 28

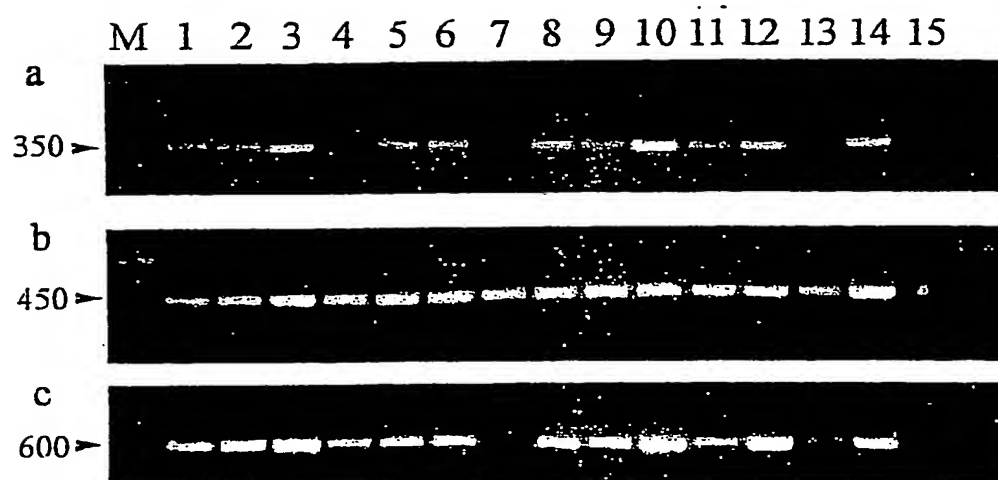


Figure 3.4

25 / 28

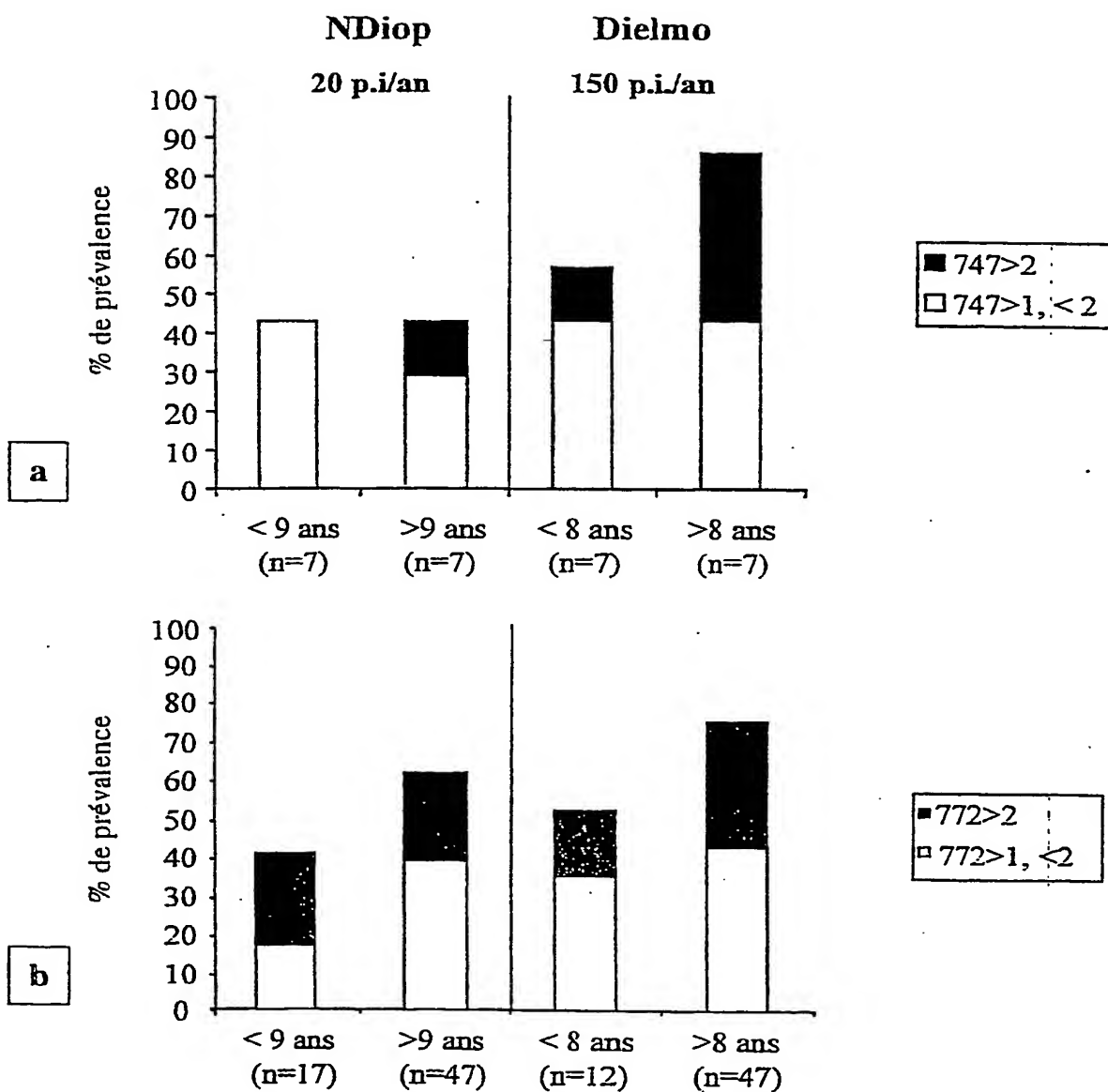


Figure 3.5

26 / 28

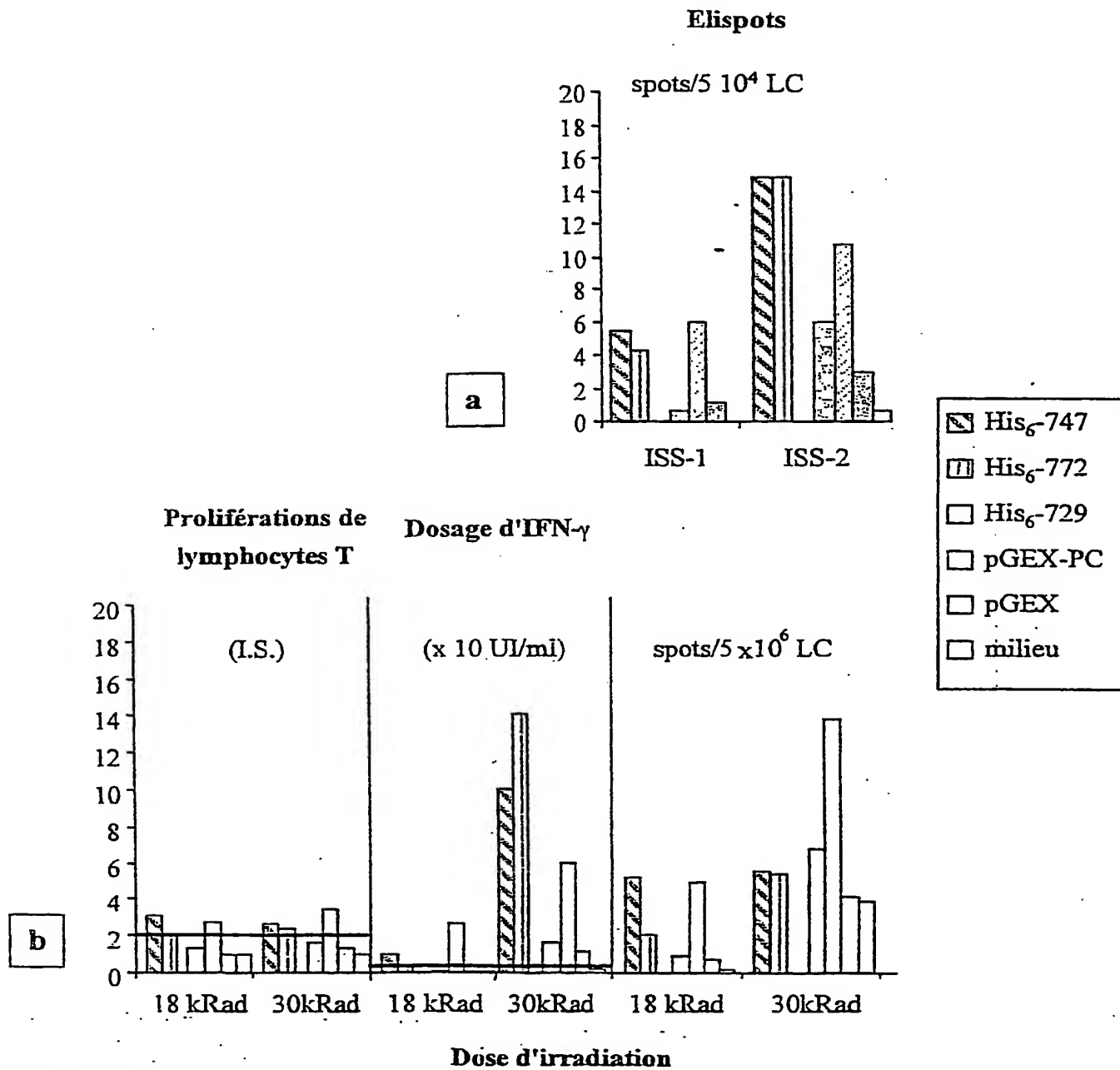


Figure 3.6

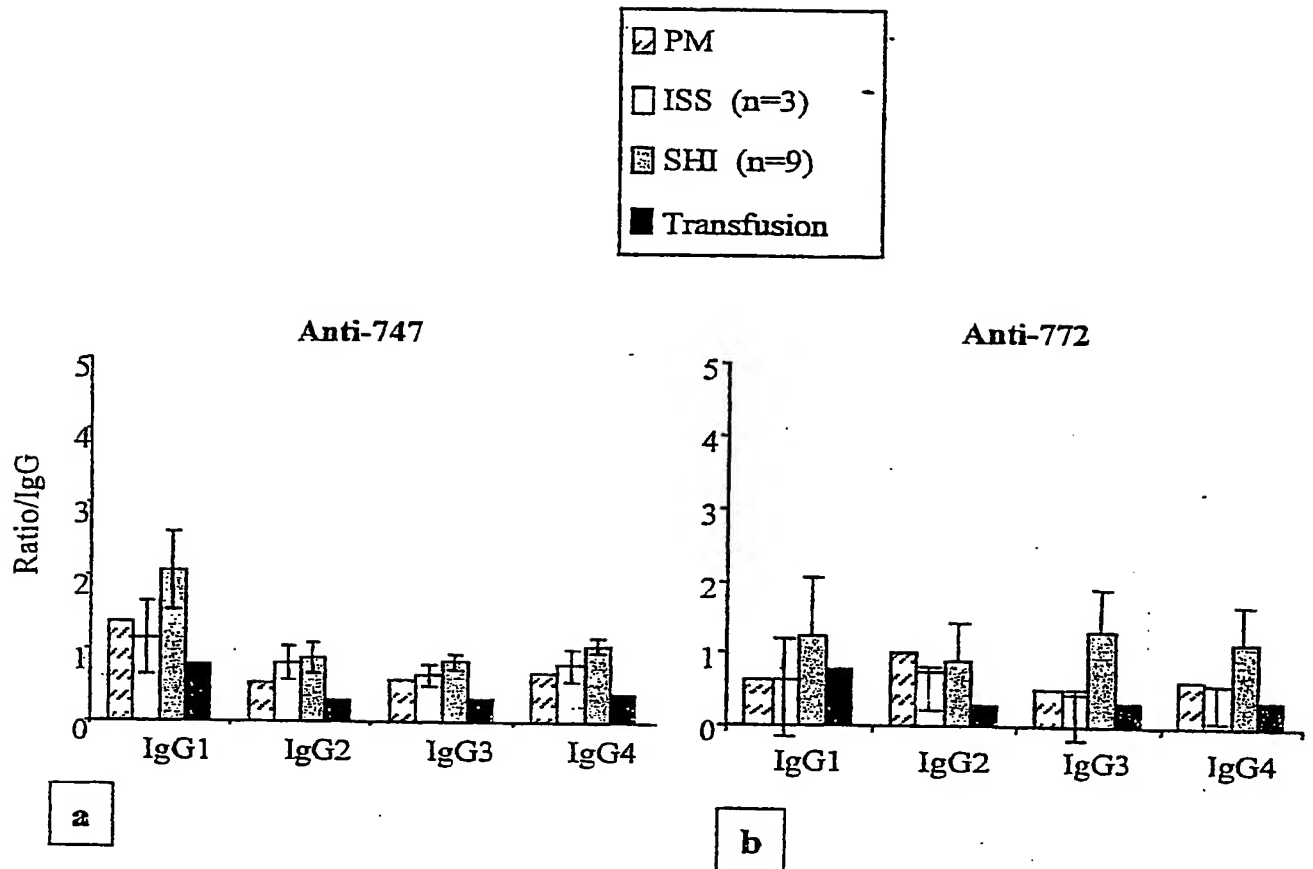


Figure 3.7

28 / 28

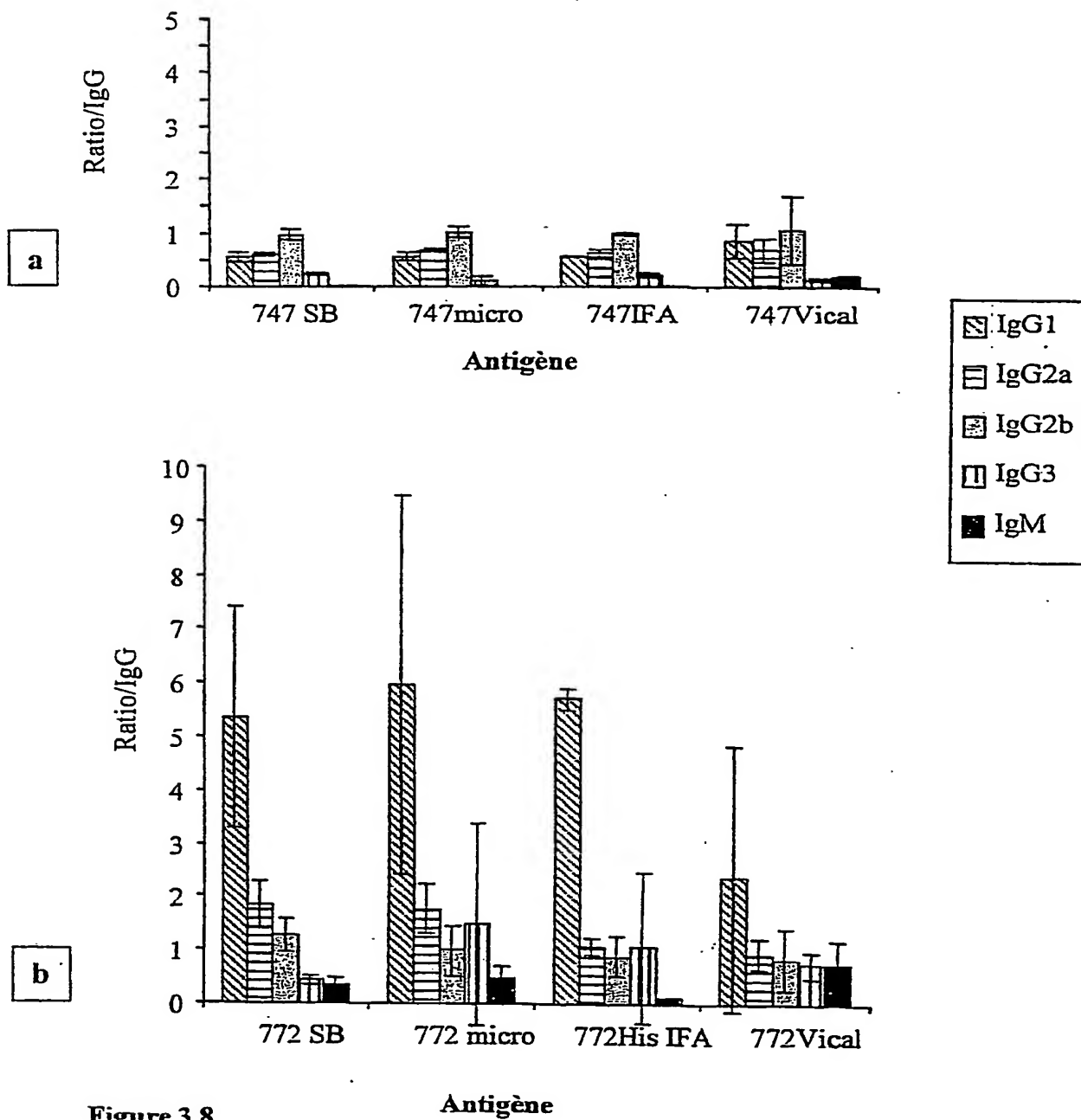


Figure 3.8

LISTAGE DES SEQUENCES

<110> Institut Pasteur

<120> ANTIGÈNES DE PLASMODIUM FALCIPARUM ET LEURS APPLICATIONS VACCINALES ET DIAGNOSTIQUES

<130> B5257AA_01.txt

<150> CA 2,345,206

<151> 2001-05-16

<150> CA 2,346,968

<151> 2001-05-23

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 192

<212> DNA

<213> Plasmodium falciparum

<400> 1

```

gaattccata tgcacgatta catatatgat gatcgtatct acaataatga taaagagaaa      60
aatgttataa aaagtgataa taaaaatggt ataaaaagtg ataataaaaa tgattataaa      120
aagtgtataa aaaatgttat aaaaagtgat aataaaaaatg ttataaaaag tgataataaa      180
aatgtggaat tc                                                              192

```

<210> 2

<211> 351

<212> DNA

<213> Plasmodium falciparum

<400> 2

```

gaattccag atcctcgaag taatgaccaa gaagatgcta ctgacgatgt tgtagaaaat      60
agtagagatg ataataatag tctctctaag agcgtagata atcaaagtaa tgtttttaaat      120
agagaagatc ctattgcttc tgaaactgaa gttgtaagtg aacctgagga ttcaagtagg      180
ataatgacta cagaagttcc aagtactact gtaaaacccc ctgatgaaaa acgatctgaa      240
gaagtaggag aaaaagaagc taaagaaatt aaagtagaac ctgttgtagc aagagccatt      300
ggagaaccaa tggaaaattc tgtgagcgta cagtcacctc ctaaggaatt c              351

```

<210> 3

<211> 64

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

2

<400> 3

Glu Phe His Met His Asp Tyr Ile Tyr Asp Asp Arg Ile Tyr Asn Asn
 1 5 10 15

Asp Lys Glu Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn Lys Asn Val Ile Lys
 20 25 30

Ser Asp Asn Lys Asn Asp Tyr Lys Lys Cys Asn Lys Asn Val Ile Lys
 35 40 45

Ser Asp Asn Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn Lys Asn Val Glu Phe
 50 55 60

<210> 4

<211> 117

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 4

Glu Phe Pro Asp Pro Arg Ser Asn Asp Gln Glu Asp Ala Thr Asp Asp
 1 5 10 15

Val Val Glu Asn Ser Arg Asp Asp Asn Asn Ser Leu Ser Asn Ser Val
 20 25 30

Asp Asn Gln Ser Asn Val Leu Asn Arg Glu Asp Pro Ile Ala Ser Glu
 35 40 45

Thr Glu Val Val Ser Glu Pro Glu Asp Ser Ser Arg Ile Met Thr Thr
 50 55 60

Glu Val Pro Ser Thr Thr Val Lys Pro Pro Asp Glu Lys Arg Ser Glu
 65 70 75 80

Glu Val Gly Glu Lys Glu Ala Lys Glu Ile Lys Val Glu Pro Val Val
 85 90 95

Pro Arg Ala Ile Gly Glu Pro Met Glu Asn Ser Val Ser Val Gln Ser
 100 105 110

Pro Pro Lys Glu Phe
 115

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Plasmodium falciparum

<400> 5

Asp Asn Lys Asn Val
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Plasmodium falciparum

<400> 6

Asp Asn Lys Asn Asp
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Plasmodium falciparum

<400> 7

Asp Lys Glu Lys Asn Val
1 5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Plasmodium falciparum

<400> 8

Lys Ser Asp Asn Lys Asn Val
1 5

<210> 9
<211> 1524
<212> DNA
<213> Plasmodium falciparum

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1524)
<223>

```

<400> 9
atg aag acg aca aaa gaa aat gac aat aat aac ata gta cat tat gta      48
Met Lys Thr Thr Lys Glu Asn Asp Asn Asn Asn Ile Val His Tyr Val
1 5 10 15

gat tgg ata aac cag att ttt aaa aag aat tct tta caa tgt gat tta      96
Asp Trp Ile Asn Gln Ile Phe Lys Lys Asn Ser Leu Gln Cys Asp Leu
20 25 30

tat ttt ttg gat gac aac aaa gaa aaa gat gtt agt aag aaa aga aaa      144
Tyr Phe Leu Asp Asp Asn Lys Glu Lys Asp Val Ser Lys Lys Arg Lys
35 40 45

gct caa ttg aag gat gaa tat gat aat ata tca agg agc aaa gaa aat      192
Ala Gln Leu Lys Asp Glu Tyr Asp Asn Ile Ser Arg Ser Lys Glu Asn
50 55 60

att aat aat tcc aaa aaa ata aaa aat gaa tta agt ata aaa gat aat      240
Ile Asn Asn Ser Lys Lys Ile Lys Asn Glu Leu Ser Ile Lys Asp Asn
65 70 75 80

atg cac gat tac ata tat gat gat cgt atc tac aat aat gat aaa gag      288
Met His Asp Tyr Ile Tyr Asp Asp Arg Ile Tyr Asn Asn Asp Lys Glu
85 90 95

aaa aat gtt ata aaa agt gat aat aaa aat gtt ata aaa agt gat aat      336
Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn
100 105 110

aaa aat gat tat aaa aag tgt aat aaa aat gtt ata aaa agt gat aat      384
Lys Asn Asp Tyr Lys Lys Cys Asn Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn
115 120 125

aaa aat gtt ata aaa agt gat aat aaa aat gtt ata aaa agt gat aat      432
Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn
130 135 140

aaa aat gtt ata aaa agt gat tat aaa agt gat gat aga aat gct tgt      480
Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Tyr Lys Ser Asp Asp Arg Asn Ala Cys
145 150 155 160

gat att tat aaa agt aat aaa aaa aat gtt cct gat aat tgc cat ata      528
Asp Ile Tyr Lys Ser Asn Lys Lys Asn Val Pro Asp Asn Cys His Ile
165 170 175

tat gat gat aat agt tca gtt gaa aat tta gat gga aaa aat aaa tta      576
Tyr Asp Asp Asn Ser Ser Val Glu Asn Leu Asp Gly Lys Asn Lys Leu
180 185 190

aat aat ata agg aac ata cat aat gat aac tca tct tca tgc gat ata      624
Asn Asn Ile Arg Asn Ile His Asn Asp Asn Ser Ser Ser Cys Asp Ile
195 200 205

tcc gat ata aaa agt gaa gat gaa tat ata gaa cca tat gaa aaa aag      672
Ser Asp Ile Lys Ser Glu Asp Glu Tyr Ile Glu Pro Tyr Glu Lys Lys
210 215 220

```

aat gaa gaa aat ata aat gaa tat aag aat aag aaa aat ata gcc aat Asn Glu Glu Asn Ile Asn Glu Tyr Lys Asn Lys Lys Asn Ile Ala Asn 225 230 235 240	720
gaa aat ata aaa gaa gga aag agt tca att tat aat gat gaa cat aat Glu Asn Ile Lys Glu Gly Lys Ser Ser Ile Tyr Asn Asp Glu His Asn 245 250 255	768
tat aat tca tta tta tat aat tct tgt aat ggt gaa ata agt aag atc Tyr Asn Ser Leu Leu Tyr Asn Ser Cys Asn Gly Glu Ile Ser Lys Ile 260 265 270	816
aac aaa ata agt agt cat aat aat att gat aat aat atg gat aat tat Asn Lys Ile Ser Ser His Asn Asn Ile Asp Asn Asn Met Asp Asn Tyr 275 280 285	864
aat acg ttt gca aat gtg aat aat ttt ata ata tat tcc tca gat gat Asn Thr Phe Ala Asn Val Asn Asn Phe Ile Ile Tyr Ser Ser Asp Asp 290 295 300	912
gaa gat aat ata tca aat tat tat aat ggt aaa gac gta tta aat gat Glu Asp Asn Ile Ser Asn Tyr Tyr Asn Gly Lys Asp Val Leu Asn Asp 305 310 315 320	960
gag att atg ttc cct ata aaa ttt aat ttt gaa aaa tta aaa aaa aat Glu Ile Met Phe Pro Ile Lys Phe Asn Phe Glu Lys Leu Lys Lys Asn 325 330 335	1008
att tat gta ata gag cat ata gac aaa ata tat tat gat aca ttt tta Ile Tyr Val Ile Glu His Ile Asp Lys Ile Tyr Tyr Asp Thr Phe Leu 340 345 350	1056
aat aaa aat cca agt gaa aaa agt gtt ttt atg aat gat gaa tct act Asn Lys Asn Pro Ser Glu Lys Ser Val Phe Met Asn Asp Glu Ser Thr 355 360 365	1104
ggt tat ttg aaa aat gat gtg aat gac aaa tgt gtt gtt gat aat ata Gly Tyr Leu Lys Asn Asp Val Asn Asp Lys Cys Val Val Asp Asn Ile 370 375 380	1152
aat gtt att aat cct tct agt gtg aat acg ttg agt aat att tca aat Asn Val Ile Asn Pro Ser Ser Val Asn Thr Leu Ser Asn Ile Ser Asn 385 390 395 400	1200
att agg aat gaa aaa ata gaa aat aat aat aag aat gaa aaa tta ata Ile Arg Asn Glu Lys Ile Glu Asn Asn Asn Lys Asn Glu Lys Leu Ile 405 410 415	1248
aaa tca tat cct aca caa tca aaa aat gtt atg agt aca ttt tcc ttt Lys Ser Tyr Pro Thr Gln Ser Lys Asn Val Met Ser Thr Phe Ser Phe 420 425 430	1296
tgg aat att gaa aag gag aca ttt ata aca aaa cct ttg tat gca caa Trp Asn Ile Glu Lys Glu Thr Phe Ile Thr Lys Pro Leu Tyr Ala Gln 435 440 445	1344

aat ttg aga aaa aaa caa ttt agt tta tta gat gaa tct gaa gag atg 1392
 Asn Leu Arg Lys Lys Gln Phe Ser Leu Leu Asp Glu Ser Glu Glu Met
 450 455 460

ata aga aat tat tca tct aat caa tat tct ata aaa ttt gta cca aga 1440
 Ile Arg Asn Tyr Ser Ser Asn Gln Tyr Ser Ile Lys Phe Val Pro Arg
 465 470 475 480

cat tta tta tat gta atg agt caa gtt gct tct cga tcc ttt ttt gat 1488
 His Leu Leu Tyr Val Met Ser Gln Val Ala Ser Arg Ser Phe Phe Asp
 485 490 495

cct tta tat aga aag cag tta ttt ttt cgt tac taa 1524
 Pro Leu Tyr Arg Lys Gln Leu Phe Phe Arg Tyr
 500 505

<210> 10
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Plasmodium falciparum

<400> 10

Met Lys Thr Thr Lys Glu Asn Asp Asn Asn Asn Ile Val His Tyr Val
 1 5 10 15

Asp Trp Ile Asn Gln Ile Phe Lys Lys Asn Ser Leu Gln Cys Asp Leu
 20 25 30

Tyr Phe Leu Asp Asp Asn Lys Glu Lys Asp Val Ser Lys Lys Arg Lys
 35 40 45

Ala Gln Leu Lys Asp Glu Tyr Asp Asn Ile Ser Arg Ser Lys Glu Asn
 50 55 60

Ile Asn Asn Ser Lys Lys Ile Lys Asn Glu Leu Ser Ile Lys Asp Asn
 65 70 75 80

Met His Asp Tyr Ile Tyr Asp Asp Arg Ile Tyr Asn Asn Asp Lys Glu
 85 90 95

Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn
 100 105 110

Lys Asn Asp Tyr Lys Lys Cys Asn Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn
 115 120 125

Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Asn
 130 135 140

Lys Asn Val Ile Lys Ser Asp Tyr Lys Ser Asp Asp Arg Asn Ala Cys
 145 150 155 160

Asp Ile Tyr Lys Ser Asn Lys Lys Asn Val Pro Asp Asn Cys His Ile
 165 170 175

Tyr Asp Asp Asn Ser Ser Val Glu Asn Leu Asp Gly Lys Asn Lys Leu
 180 185 190

Asn Asn Ile Arg Asn Ile His Asn Asp Asn Ser Ser Ser Cys Asp Ile
 195 200 205

Ser Asp Ile Lys Ser Glu Asp Glu Tyr Ile Glu Pro Tyr Glu Lys Lys
 210 215 220

Asn Glu Glu Asn Ile Asn Glu Tyr Lys Asn Lys Lys Asn Ile Ala Asn
 225 230 235 240

Glu Asn Ile Lys Glu Gly Lys Ser Ser Ile Tyr Asn Asp Glu His Asn
 245 250 255

Tyr Asn Ser Leu Leu Tyr Asn Ser Cys Asn Gly Glu Ile Ser Lys Ile
 260 265 270

Asn Lys Ile Ser Ser His Asn Asn Ile Asp Asn Asn Met Asp Asn Tyr
 275 280 285

Asn Thr Phe Ala Asn Val Asn Asn Phe Ile Ile Tyr Ser Ser Asp Asp
 290 295 300

Glu Asp Asn Ile Ser Asn Tyr Tyr Asn Gly Lys Asp Val Leu Asn Asp
 305 310 315 320

Glu Ile Met Phe Pro Ile Lys Phe Asn Phe Glu Lys Leu Lys Lys Asn
 325 330 335

Ile Tyr Val Ile Glu His Ile Asp Lys Ile Tyr Tyr Asp Thr Phe Leu
 340 345 350

Asn Lys Asn Pro Ser Glu Lys Ser Val Phe Met Asn Asp Glu Ser Thr
 355 360 365

Gly Tyr Leu Lys Asn Asp Val Asn Asp Lys Cys Val Val Asp Asn Ile
 370 375 380

Asn Val Ile Asn Pro Ser Ser Val Asn Thr Leu Ser Asn Ile Ser Asn
 385 390 395 400

Ile Arg Asn Glu Lys Ile Glu Asn Asn Asn Lys Asn Glu Lys Leu Ile
 405 410 415

Lys Ser Tyr Pro Thr Gln Ser Lys Asn Val Met Ser Thr Phe Ser Phe
 420 425 430

Trp Asn Ile Glu Lys Glu Thr Phe Ile Thr Lys Pro Leu Tyr Ala Gln
 435 440 445

Asn Leu Arg Lys Lys Gln Phe Ser Leu Leu Asp Glu Ser Glu Glu Met
 450 455 460

Ile Arg Asn Tyr Ser Ser Asn Gln Tyr Ser Ile Lys Phe Val Pro Arg
 465 470 475 480

His Leu Leu Tyr Val Met Ser Gln Val Ala Ser Arg Ser Phe Phe Asp
 485 490 495

Pro Leu Tyr Arg Lys Gln Leu Phe Phe Arg Tyr
 500 505

<210> 11
 <211> 5050
 <212> DNA
 <213> Plasmodium falciparum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (4464)
 <223>

<220>
 <221> CDS
 <222> (4557) .. (4634)
 <223>

<220>
 <221> CDS
 <222> (4751) .. (4837)
 <223>

<220>

<221> CDS

<222> (4973) .. (5047)

<223>

<400> 11

atg aaa ggg aaa atg aat atg tgt ttg ttt ttt ttc tat tct ata tta	48
Met Lys Gly Lys Met Asn Met Cys Leu Phe Phe Phe Tyr Ser Ile Leu	
1 5 10 15	
tat gtt gta tta tgt acc tat gta tta ggt ata agt gaa gag tat ttg	96
Tyr Val Val Leu Cys Thr Tyr Val Leu Gly Ile Ser Glu Glu Tyr Leu	
20 25 30	
aag gaa agg ccc caa ggt tta aat gtt gag act aat aat aat aat aat	144
Lys Glu Arg Pro Gln Gly Leu Asn Val Glu Thr Asn Asn Asn Asn Asn	
35 40 45	
aat aat aat aat aat aat agt aat agt aac gat gcg atg tct ttt gta	192
Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser Asn Ser Asn Asp Ala Met Ser Phe Val	
50 55 60	
aat gaa gta ata agg ttt ata gaa aac gag aag gat gat aaa gaa gat	240
Asn Glu Val Ile Arg Phe Ile Glu Asn Glu Lys Asp Asp Lys Glu Asp	
65 70 75 80	
aaa aaa gtg aag ata ata tct aga cct gtt gag aat aca tta cat aga	288
Lys Lys Val Lys Ile Ile Ser Arg Pro Val Glu Asn Thr Leu His Arg	
85 90 95	
tat cca gtt agt tct ttt ctg aat atc aaa aag tat ggt agg aaa ggg	336
Tyr Pro Val Ser Ser Phe Leu Asn Ile Lys Lys Tyr Gly Arg Lys Gly	
100 105 110	
gaa tat ttg aat aga aat agt ttt gtt caa aga tca tat ata agg ggt	384
Glu Tyr Leu Asn Arg Asn Ser Phe Val Gln Arg Ser Tyr Ile Arg Gly	
115 120 125	
tgt aaa gga aaa aga agc aca cat aca tgg ata tgt gaa aat aaa ggg	432
Cys Lys Gly Lys Arg Ser Thr His Thr Trp Ile Cys Glu Asn Lys Gly	
130 135 140	
aat aat aat ata tgt att cct gat aga cgt gta caa tta tgt ata aca	480
Asn Asn Asn Ile Cys Ile Pro Asp Arg Arg Val Gln Leu Cys Ile Thr	
145 150 155 160	
gct ctt caa gat tta aaa aat tca gga tct gaa acg act gat aga aaa	528
Ala Leu Gln Asp Leu Lys Asn Ser Gly Ser Glu Thr Thr Asp Arg Lys	
165 170 175	
tta tta aga gat aaa gta ttt gat tca gct atg tat gaa act gat ttg	576
Leu Leu Arg Asp Lys Val Phe Asp Ser Ala Met Tyr Glu Thr Asp Leu	
180 185 190	
tta tgg aat aaa tat ggt ttt cgt gga ttt gat gat ttt tgt gac gat	624
Leu Trp Asn Lys Tyr Gly Phe Arg Gly Phe Asp Asp Phe Cys Asp Asp	
195 200 205	

gta	aaa	aat	agt	tat	tta	gat	tat	aaa	gat	gtt	ata	ttt	gga	acc	gat	672
Val	Lys	Asn	Ser	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Lys	Asp	Val	Ile	Phe	Gly	Thr	Asp	
	210					215					220					
tta	gat	aaa	aat	aat	ata	tca	aag	tta	gta	gag	gaa	tca	tta	aaa	cgt	720
Leu	Asp	Lys	Asn	Asn	Ile	Ser	Lys	Leu	Val	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Arg	
225					230					235					240	
ttt	ttt	aaa	aaa	gat	agt	agt	gta	ctt	aat	cct	act	gct	tgg	tgg	aga	768
Phe	Phe	Lys	Lys	Asp	Ser	Ser	Val	Leu	Asn	Pro	Thr	Ala	Trp	Trp	Arg	
				245					250						255	
agg	tat	gga	aca	aga	cta	tgg	aaa	act	atg	ata	cag	cca	tat	gct	cat	816
Arg	Tyr	Gly	Thr	Arg	Leu	Trp	Lys	Thr	Met	Ile	Gln	Pro	Tyr	Ala	His	
			260					265						270		
tta	gga	tgt	aga	aaa	cct	gat	gag	aat	gaa	cct	cag	ata	aat	aga	tgg	864
Leu	Gly	Cys	Arg	Lys	Pro	Asp	Glu	Asn	Glu	Pro	Gln	Ile	Asn	Arg	Trp	
		275					280					285				
att	ctg	gaa	tgg	ggg	aaa	tat	aat	tgt	aga	tta	atg	aag	gag	aaa	gaa	912
Ile	Leu	Glu	Trp	Gly	Lys	Tyr	Asn	Cys	Arg	Leu	Met	Lys	Glu	Lys	Glu	
	290					295					300					
aaa	ttg	tta	aca	gga	gaa	tgt	tct	gtt	aat	aga	aaa	aaa	tct	gac	tgc	960
Lys	Leu	Leu	Thr	Gly	Glu	Cys	Ser	Val	Asn	Arg	Lys	Lys	Ser	Asp	Cys	
305					310					315					320	
tca	acc	gga	tgt	aat	aat	gag	tgt	tat	acc	tat	agg	agt	ctt	att	aat	1008
Ser	Thr	Gly	Cys	Asn	Asn	Glu	Cys	Tyr	Thr	Tyr	Arg	Ser	Leu	Ile	Asn	
				325					330					335		
aga	caa	aga	tat	gag	gtc	tct	ata	tta	gga	aaa	aaa	tat	att	aaa	gta	1056
Arg	Gln	Arg	Tyr	Glu	Val	Ser	Ile	Leu	Gly	Lys	Lys	Tyr	Ile	Lys	Val	
			340					345					350			
gta	cga	tat	act	ata	ttt	agg	aga	aaa	ata	gtt	caa	cct	gat	aat	gct	1104
Val	Arg	Tyr	Thr	Ile	Phe	Arg	Arg	Lys	Ile	Val	Gln	Pro	Asp	Asn	Ala	
		355				360						365				
ttg	gat	ttt	tta	aaa	tta	aat	tgt	tct	gag	tgt	aag	gat	att	gat	ttt	1152
Leu	Asp	Phe	Leu	Lys	Leu	Asn	Cys	Ser	Glu	Cys	Lys	Asp	Ile	Asp	Phe	
	370					375					380					
aaa	ccc	ttt	ttt	gaa	ttt	gaa	tat	ggg	aaa	tat	gaa	gaa	aaa	tgt	atg	1200
Lys	Pro	Phe	Phe	Glu	Phe	Glu	Tyr	Gly	Lys	Tyr	Glu	Glu	Lys	Cys	Met	
385					390					395					400	
tgt	caa	tca	tat	att	gat	tta	aaa	atc	caa	ttt	aaa	aat	aat	gat	att	1248
Cys	Gln	Ser	Tyr	Ile	Asp	Leu	Lys	Ile	Gln	Phe	Lys	Asn	Asn	Asp	Ile	
				405					410					415		
tgt	tca	ttt	aat	gct	caa	aca	gat	act	gtt	tct	agc	gat	aaa	aga	ttt	1296
Cys	Ser	Phe	Asn	Ala	Gln	Thr	Asp	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Lys	Arg	Phe	
			420					425					430			

tgt ctt gaa aag aaa gaa ttt aaa cca tgg aaa tgt gat aaa aat tct	1344
Cys Leu Glu Lys Lys Glu Phe Lys Pro Trp Lys Cys Asp Lys Asn Ser	
435 440 445	
ttt gaa aca gtt cat cat aaa ggt gta tgt gtg tca ccg aga aga caa	1392
Phe Glu Thr Val His His Lys Gly Val Cys Val Ser Pro Arg Arg Gln	
450 455 460	
ggt ttt tgt tta gga aat ttg aac tat cta ctg aat gat gat att tat	1440
Gly Phe Cys Leu Gly Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Asn Asp Asp Ile Tyr	
465 470 475 480	
aat gta cat aat tca caa cta ctt atc gaa att ata atg gct tct aaa	1488
Asn Val His Asn Ser Gln Leu Leu Ile Glu Ile Ile Met Ala Ser Lys	
485 490 495	
caa gaa gga aag tta tta tgg aaa aaa cat gga aca ata ctt gat aac	1536
Gln Glu Gly Lys Leu Leu Trp Lys Lys His Gly Thr Ile Leu Asp Asn	
500 505 510	
cag aat gca tgc aaa tat ata aat gat agt tat gtt gat tat aaa gat	1584
Gln Asn Ala Cys Lys Tyr Ile Asn Asp Ser Tyr Val Asp Tyr Lys Asp	
515 520 525	
ata gtt att gga aat gat tta tgg aat gat aac aac tct ata aaa gtt	1632
Ile Val Ile Gly Asn Asp Leu Trp Asn Asp Asn Asn Ser Ile Lys Val	
530 535 540	
caa aat aat tta aat tta att ttt gaa aga aat ttt ggt tat aaa gtt	1680
Gln Asn Asn Leu Asn Leu Ile Phe Glu Arg Asn Phe Gly Tyr Lys Val	
545 550 555 560	
gga aga aat aaa ctc ttt aaa aca att aaa gaa tta aaa aat gta tgg	1728
Gly Arg Asn Lys Leu Phe Lys Thr Ile Lys Glu Leu Lys Asn Val Trp	
565 570 575	
tgg ata tta aat aga aat aaa gta tgg gaa tca atg aga tgt gga att	1776
Trp Ile Leu Asn Arg Asn Lys Val Trp Glu Ser Met Arg Cys Gly Ile	
580 585 590	
gac gaa gta gat caa cgt aga aaa act tgt gaa aga ata gat gaa cta	1824
Asp Glu Val Asp Gln Arg Arg Lys Thr Cys Glu Arg Ile Asp Glu Leu	
595 600 605	
gaa aac atg cca caa ttc ttt aga tgg ttt tca caa tgg gca cat ttc	1872
Glu Asn Met Pro Gln Phe Phe Arg Trp Phe Ser Gln Trp Ala His Phe	
610 615 620	
ttt tgt aag gaa aaa gaa tat tgg gaa tta aaa tta aat gat aaa tgt	1920
Phe Cys Lys Glu Lys Glu Tyr Trp Glu Leu Lys Leu Asn Asp Lys Cys	
625 630 635 640	
aca ggt aat aat gga aaa tcc tta tgt cag gat aaa aca tgt caa aat	1968
Thr Gly Asn Asn Gly Lys Ser Leu Cys Gln Asp Lys Thr Cys Gln Asn	
645 650 655	

gtg tgt act aat atg aat tat tgg aca tat act aga aaa tta gct tat Val Cys Thr Asn Met Asn Tyr Trp Thr Tyr Thr Arg Lys Leu Ala Tyr 660 665 670	2016
gaa ata caa tcc gta aaa tat gat aaa gat aga aaa tta ttt agt ctt Glu Ile Gln Ser Val Lys Tyr Asp Lys Asp Arg Lys Leu Phe Ser Leu 675 680 685	2064
gct aaa gac aaa aat gta act aca ttt tta aag gaa aat gca aaa aat Ala Lys Asp Lys Asn Val Thr Thr Phe Leu Lys Glu Asn Ala Lys Asn 690 695 700	2112
tgt tct aat ata gat ttt aca aaa ata ttc gat cag ctt gac aaa ctc Cys Ser Asn Ile Asp Phe Thr Lys Ile Phe Asp Gln Leu Asp Lys Leu 705 710 715 720	2160
ttt aag gaa aga tgt tca tgt atg gat aca caa gtt tta gaa gta aaa Phe Lys Glu Arg Cys Ser Cys Met Asp Thr Gln Val Leu Glu Val Lys 725 730 735	2208
aac aaa gaa atg tta tct ata gac tca aat agt gaa gat gcg aca gat Asn Lys Glu Met Leu Ser Ile Asp Ser Asn Ser Glu Asp Ala Thr Asp 740 745 750	2256
ata agt gag aaa aat gga gag gaa gaa tta tat gta aat cac aat tct Ile Ser Glu Lys Asn Gly Glu Glu Glu Leu Tyr Val Asn His Asn Ser 755 760 765	2304
gtg agt gtc gca agt ggt aat aaa gaa atc gaa aag agt aag gat gaa Val Ser Val Ala Ser Gly Asn Lys Glu Ile Glu Lys Ser Lys Asp Glu 770 775 780	2352
aag caa cct gaa aaa gaa gca aaa caa act aat gga act tta acc gta Lys Gln Pro Glu Lys Glu Ala Lys Gln Thr Asn Gly Thr Leu Thr Val 785 790 795 800	2400
cga act gac aaa gat tca gat aga aac aaa gga aaa gat aca gct act Arg Thr Asp Lys Asp Ser Asp Arg Asn Lys Gly Lys Asp Thr Ala Thr 805 810 815	2448
gat aca aaa aat tca cct gaa aat tta aaa gta cag gaa cat gga aca Asp Thr Lys Asn Ser Pro Glu Asn Leu Lys Val Gln Glu His Gly Thr 820 825 830	2496
aat gga gaa aca ata aaa gaa gaa cca cca aaa tta cct gaa tca tct Asn Gly Glu Thr Ile Lys Glu Glu Pro Pro Lys Leu Pro Glu Ser Ser 835 840 845	2544
gaa aca tta caa tca caa gaa caa tta gaa gca gaa gca caa aaa caa Glu Thr Leu Gln Ser Gln Glu Gln Leu Glu Ala Glu Ala Gln Lys Gln 850 855 860	2592
aaa caa gaa gaa gaa cca aaa aaa aaa caa gaa gaa gaa cca aaa aaa Lys Gln Glu Glu Glu Pro Lys Lys Lys Gln Glu Glu Glu Pro Lys Lys 865 870 875 880	2640

aaa caa gaa gaa gaa caa aaa cga gaa caa gaa caa aaa caa gaa caa Lys Gln Glu Glu Glu Gln Lys Arg Glu Gln Glu Gln Lys Gln Glu Gln	2688
885 890 895	
gaa gaa gaa gaa caa aaa caa gaa gaa gaa caa caa ata caa gat caa Glu Glu Glu Glu Gln Lys Gln Glu Glu Glu Gln Gln Ile Gln Asp Gln	2736
900 905 910	
tca caa agt gga tta gat caa tcc tca aaa gta gga gta gcg agt gaa Ser Gln Ser Gly Leu Asp Gln Ser Ser Lys Val Gly Val Ala Ser Glu	2784
915 920 925	
caa aat gaa att tct tca gga caa gaa caa aac gta aaa agc tct tca Gln Asn Glu Ile Ser Ser Gly Gln Glu Gln Asn Val Lys Ser Ser Ser	2832
930 935 940	
cct gaa gta gtt cca caa gaa aca act agt gaa aat ggg tca tca caa Pro Glu Val Val Pro Gln Glu Thr Thr Ser Glu Asn Gly Ser Ser Gln	2880
945 950 955 960	
gac aca aaa ata tca agt act gaa cca aat gag aat tct gtt gta gat Asp Thr Lys Ile Ser Ser Thr Glu Pro Asn Glu Asn Ser Val Val Asp	2928
965 970 975	
aga gca aca gat agt atg aat tta gat cct gaa aag gtt cat aat gaa Arg Ala Thr Asp Ser Met Asn Leu Asp Pro Glu Lys Val His Asn Glu	2976
980 985 990	
aat atg agt gat cca aat aca aat act gaa cca gat gca tct tta aaa Asn Met Ser Asp Pro Asn Thr Asn Thr Glu Pro Asp Ala Ser Leu Lys	3024
995 1000 1005	
gat gat aag aag gaa gtt gat gat gcc aaa aaa gaa ctt caa tct Asp Asp Lys Lys Glu Val Asp Asp Ala Lys Lys Glu Leu Gln Ser	3069
1010 1015 1020	
act gta tca aga att gaa tct aat gaa cag gac gtt caa agt aca Thr Val Ser Arg Ile Glu Ser Asn Glu Gln Asp Val Gln Ser Thr	3114
1025 1030 1035	
cca ccc gaa gat act cct act gtt gaa gga aaa gta gga gat aaa Pro Pro Glu Asp Thr Pro Thr Val Glu Gly Lys Val Gly Asp Lys	3159
1040 1045 1050	
gca gaa atg tta act tct ccg cat gcg aca gat aat tct gag tcg Ala Glu Met Leu Thr Ser Pro His Ala Thr Asp Asn Ser Glu Ser	3204
1055 1060 1065	
gaa tca ggt tta aat cca act gat gac att aaa aca act gat ggt Glu Ser Gly Leu Asn Pro Thr Asp Asp Ile Lys Thr Thr Asp Gly	3249
1070 1075 1080	
gtt gtt aaa gaa caa gaa ata tta ggg gga ggt gaa agt gca act Val Val Lys Glu Gln Glu Ile Leu Gly Gly Gly Glu Ser Ala Thr	3294
1085 1090 1095	

gaa aca tca aaa agt aat tta	gaa aaa cct aag gat	ggt gaa cct	3339
Glu Thr Ser Lys Ser Asn Leu	Glu Lys Pro Lys Asp	Val Glu Pro	
1100	1105	1110	
tct cat gaa ata tct gaa cct	ggt ctt tct ggt aca	act ggt aaa	3384
Ser His Glu Ile Ser Glu Pro	Val Leu Ser Gly Thr	Thr Gly Lys	
1115	1120	1125	
gaa gaa tca gag tta tta aaa	agt aaa tcg ata gag	acg aag ggg	3429
Glu Glu Ser Glu Leu Leu Lys	Ser Lys Ser Ile Glu	Thr Lys Gly	
1130	1135	1140	
gaa aca gat cct cga agt aat	gac caa gaa gat gct	act gac gat	3474
Glu Thr Asp Pro Arg Ser Asn	Asp Gln Glu Asp Ala	Thr Asp Asp	
1145	1150	1155	
ggt gta gaa aat agt aga gat	gat aat aat agt ctc	tct aat agc	3519
Val Val Glu Asn Ser Arg Asp	Asp Asn Asn Ser Leu	Ser Asn Ser	
1160	1165	1170	
gta gat aat caa agt aat gtt	tta aat aga gaa gat	cct att gct	3564
Val Asp Asn Gln Ser Asn Val	Leu Asn Arg Glu Asp	Pro Ile Ala	
1175	1180	1185	
tct gaa act gaa gtt gta agt	gaa cct gag gat tca	agt agg ata	3609
Ser Glu Thr Glu Val Val Ser	Glu Pro Glu Asp Ser	Ser Arg Ile	
1190	1195	1200	
atg act aca gaa gtt cca agt	act act gta aaa ccc	cct gat gaa	3654
Met Thr Thr Glu Val Pro Ser	Thr Thr Val Lys Pro	Pro Asp Glu	
1205	1210	1215	
aaa cga tct gaa gaa gta gga	gaa aaa gaa gct aaa	gaa att aaa	3699
Lys Arg Ser Glu Glu Val Gly	Glu Lys Glu Ala Lys	Glu Ile Lys	
1220	1225	1230	
gta gaa cct gtt gta cca aga	gcc att gga gaa cca	atg gaa aat	3744
Val Glu Pro Val Val Pro Arg	Ala Ile Gly Glu Pro	Met Glu Asn	
1235	1240	1245	
tct gtg agc gta cag tcc cct	cct aat gta gaa gat	ggt gaa aaa	3789
Ser Val Ser Val Gln Ser Pro	Pro Asn Val Glu Asp	Val Glu Lys	
1250	1255	1260	
gaa aca ttg ata tct gag aat	aat gga tta cat aat	gat aca cac	3834
Glu Thr Leu Ile Ser Glu Asn	Asn Gly Leu His Asn	Asp Thr His	
1265	1270	1275	
aga gga aat atc agt gaa aag	gat tta atc gat att	cat ttg tta	3879
Arg Gly Asn Ile Ser Glu Lys	Asp Leu Ile Asp Ile	His Leu Leu	
1280	1285	1290	
aga aat gaa gcg ggt agt aca	ata tta gat gat tct	aga aga aat	3924
Arg Asn Glu Ala Gly Ser Thr	Ile Leu Asp Asp Ser	Arg Arg Asn	
1295	1300	1305	

gga gaa atg aca gaa ggt agc gaa agt gat gtt gga gaa tta caa Gly Glu Met Thr Glu Gly Ser Glu Ser Asp Val Gly Glu Leu Gln 1310 1315 1320	3969
gaa cat aat ttt agc aca caa caa aaa gat gaa aaa gat ttt gac Glu His Asn Phe Ser Thr Gln Gln Lys Asp Glu Lys Asp Phe Asp 1325 1330 1335	4014
caa att gcg agc gat aga gaa aaa gaa gaa att caa aaa tta ctt Gln Ile Ala Ser Asp Arg Glu Lys Glu Glu Ile Gln Lys Leu Leu 1340 1345 1350	4059
aat ata gga cat gaa gag gat gaa gat gta tta aaa atg gat aga Asn Ile Gly His Glu Glu Asp Glu Asp Val Leu Lys Met Asp Arg 1355 1360 1365	4104
aca gag gat agt atg agt gat gga gtt aat agt cat ttg tat tat Thr Glu Asp Ser Met Ser Asp Gly Val Asn Ser His Leu Tyr Tyr 1370 1375 1380	4149
aat aat cta tca agt gaa gaa aaa atg gaa caa tat aat aat aga Asn Asn Leu Ser Ser Glu Glu Lys Met Glu Gln Tyr Asn Asn Arg 1385 1390 1395	4194
gat gct tct aaa gat aga gaa gaa ata ttg aat agg tca aac aca Asp Ala Ser Lys Asp Arg Glu Glu Ile Leu Asn Arg Ser Asn Thr 1400 1405 1410	4239
aat aca tgt tct aat gaa cat tca tta aaa tat tgt caa tat atg Asn Thr Cys Ser Asn Glu His Ser Leu Lys Tyr Cys Gln Tyr Met 1415 1420 1425	4284
gaa aga aat aag gat tta tta gaa aca tgt tct gaa gac aaa agg Glu Arg Asn Lys Asp Leu Leu Glu Thr Cys Ser Glu Asp Lys Arg 1430 1435 1440	4329
tta cat tta tgt tgt gaa ata tca gat tat tgt tta aaa ttt ttc Leu His Leu Cys Cys Glu Ile Ser Asp Tyr Cys Leu Lys Phe Phe 1445 1450 1455	4374
aat cct aaa tcg ata gaa tac ttt gat tgt aca caa aaa gaa ttt Asn Pro Lys Ser Ile Glu Tyr Phe Asp Cys Thr Gln Lys Glu Phe 1460 1465 1470	4419
gat gac cct aca tat aat tgt ttt aga aaa caa aga ttt aca agt Asp Asp Pro Thr Tyr Asn Cys Phe Arg Lys Gln Arg Phe Thr Ser 1475 1480 1485	4464
atgtcatgtt ataaaattaa aaacaatata cattaatatg ttaataaaaa aaataatata	4524
tttttttctc tttttctttt tttttaatag gt atg cat tat att gcc ggg ggt Met His Tyr Ile Ala Gly Gly 1490 1495	4577
ggt ata ata gcc ctt tta ttg ttt att tta ggt tca gcc agc tat Gly Ile Ile Ala Leu Leu Leu Phe Ile Leu Gly Ser Ala Ser Tyr 1500 1505 1510	4622

agg aag aat ttg taagaaaaaa aggatgaaga aatataaaca aaaatataaa 4674
Arg Lys Asn Leu

tatatgcata tatatttaag tattataaga acatatatat aaataaatat gtatatatttt 4734

attttattat tatagg gat gat gaa aaa gga ttc tac gat tct aat tta 4783
Asp Asp Glu Lys Gly Phe Tyr Asp Ser Asn Leu
1515 1520 1525

aat gat tct gct ttt gaa tat aat aat aat aaa tat aat aaa tta 4828
Asn Asp Ser Ala Phe Glu Tyr Asn Asn Asn Lys Tyr Asn Lys Leu
1530 1535 1540

cct tat atg tgtaaggaaa aaactaaaaa acaaaaaaaaaa aaaaaaatat 4877
Pro Tyr Met

atatatatat atatataattt acggatgcat ttccacattc ctattatttc ttattcttat 4937

aatttttatt atttatttat ttattttttt ttttc gta gtt gat caa caa ata 4990
Val Val Asp Gln Gln Ile
1545

aat gta gta aat tct gat tta tat tcg gag ggt att tat gat gac 5035
Asn Val Val Asn Ser Asp Leu Tyr Ser Glu Gly Ile Tyr Asp Asp
1550 1555 1560

aca acg aca ttt taa 5050
Thr Thr Thr Phe
1565

<210> 12
<211> 1568
<212> PRT
<213> Plasmodium falciparum

<400> 12

Met Lys Gly Lys Met Asn Met Cys Leu Phe Phe Phe Tyr Ser Ile Leu
1 5 10 15

Tyr Val Val Leu Cys Thr Tyr Val Leu Gly Ile Ser Glu Glu Tyr Leu
20 25 30

Lys Glu Arg Pro Gln Gly Leu Asn Val Glu Thr Asn Asn Asn Asn Asn
35 40 45

Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser Asn Ser Asn Asp Ala Met Ser Phe Val
50 55 60

Asn Glu Val Ile Arg Phe Ile Glu Asn Glu Lys Asp Asp Lys Glu Asp
65 70 75 80

Lys Lys Val Lys Ile Ile Ser Arg Pro Val Glu Asn Thr Leu His Arg
 85 90 95

Tyr Pro Val Ser Ser Phe Leu Asn Ile Lys Lys Tyr Gly Arg Lys Gly
 100 105 110

Glu Tyr Leu Asn Arg Asn Ser Phe Val Gln Arg Ser Tyr Ile Arg Gly
 115 120 125

Cys Lys Gly Lys Arg Ser Thr His Thr Trp Ile Cys Glu Asn Lys Gly
 130 135 140

Asn Asn Asn Ile Cys Ile Pro Asp Arg Arg Val Gln Leu Cys Ile Thr
 145 150 155 160

Ala Leu Gln Asp Leu Lys Asn Ser Gly Ser Glu Thr Thr Asp Arg Lys
 165 170 175

Leu Leu Arg Asp Lys Val Phe Asp Ser Ala Met Tyr Glu Thr Asp Leu
 180 185 190

Leu Trp Asn Lys Tyr Gly Phe Arg Gly Phe Asp Asp Phe Cys Asp Asp
 195 200 205

Val Lys Asn Ser Tyr Leu Asp Tyr Lys Asp Val Ile Phe Gly Thr Asp
 210 215 220

Leu Asp Lys Asn Asn Ile Ser Lys Leu Val Glu Glu Ser Leu Lys Arg
 225 230 235 240

Phe Phe Lys Lys Asp Ser Ser Val Leu Asn Pro Thr Ala Trp Trp Arg
 245 250 255

Arg Tyr Gly Thr Arg Leu Trp Lys Thr Met Ile Gln Pro Tyr Ala His
 260 265 270

Leu Gly Cys Arg Lys Pro Asp Glu Asn Glu Pro Gln Ile Asn Arg Trp
 275 280 285

Ile Leu Glu Trp Gly Lys Tyr Asn Cys Arg Leu Met Lys Glu Lys Glu
 290 295 300

Lys Leu Leu Thr Gly Glu Cys Ser Val Asn Arg Lys Lys Ser Asp Cys
 305 310 315 320

Ser Thr Gly Cys Asn Asn Glu Cys Tyr Thr Tyr Arg Ser Leu Ile Asn
325 330 335

Arg Gln Arg Tyr Glu Val Ser Ile Leu Gly Lys Lys Tyr Ile Lys Val
340 345 350

Val Arg Tyr Thr Ile Phe Arg Arg Lys Ile Val Gln Pro Asp Asn Ala
355 360 365

Leu Asp Phe Leu Lys Leu Asn Cys Ser Glu Cys Lys Asp Ile Asp Phe
370 375 380

Lys Pro Phe Phe Glu Phe Glu Tyr Gly Lys Tyr Glu Glu Lys Cys Met
385 390 395 400

Cys Gln Ser Tyr Ile Asp Leu Lys Ile Gln Phe Lys Asn Asn Asp Ile
405 410 415

Cys Ser Phe Asn Ala Gln Thr Asp Thr Val Ser Ser Asp Lys Arg Phe
420 425 430

Cys Leu Glu Lys Lys Glu Phe Lys Pro Trp Lys Cys Asp Lys Asn Ser
435 440 445

Phe Glu Thr Val His His Lys Gly Val Cys Val Ser Pro Arg Arg Gln
450 455 460

Gly Phe Cys Leu Gly Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Asn Asp Asp Ile Tyr
465 470 475 480

Asn Val His Asn Ser Gln Leu Leu Ile Glu Ile Ile Met Ala Ser Lys
485 490 495

Gln Glu Gly Lys Leu Leu Trp Lys Lys His Gly Thr Ile Leu Asp Asn
500 505 510

Gln Asn Ala Cys Lys Tyr Ile Asn Asp Ser Tyr Val Asp Tyr Lys Asp
515 520 525

Ile Val Ile Gly Asn Asp Leu Trp Asn Asp Asn Asn Ser Ile Lys Val
530 535 540

Gln Asn Asn Leu Asn Leu Ile Phe Glu Arg Asn Phe Gly Tyr Lys Val
 545 550 555 560

Gly Arg Asn Lys Leu Phe Lys Thr Ile Lys Glu Leu Lys Asn Val Trp
 565 570 575

Trp Ile Leu Asn Arg Asn Lys Val Trp Glu Ser Met Arg Cys Gly Ile
 580 585 590

Asp Glu Val Asp Gln Arg Arg Lys Thr Cys Glu Arg Ile Asp Glu Leu
 595 600 605

Glu Asn Met Pro Gln Phe Phe Arg Trp Phe Ser Gln Trp Ala His Phe
 610 615 620

Phe Cys Lys Glu Lys Glu Tyr Trp Glu Leu Lys Leu Asn Asp Lys Cys
 625 630 635 640

Thr Gly Asn Asn Gly Lys Ser Leu Cys Gln Asp Lys Thr Cys Gln Asn
 645 650 655

Val Cys Thr Asn Met Asn Tyr Trp Thr Tyr Thr Arg Lys Leu Ala Tyr
 660 665 670

Glu Ile Gln Ser Val Lys Tyr Asp Lys Asp Arg Lys Leu Phe Ser Leu
 675 680 685

Ala Lys Asp Lys Asn Val Thr Thr Phe Leu Lys Glu Asn Ala Lys Asn
 690 695 700

Cys Ser Asn Ile Asp Phe Thr Lys Ile Phe Asp Gln Leu Asp Lys Leu
 705 710 715 720

Phe Lys Glu Arg Cys Ser Cys Met Asp Thr Gln Val Leu Glu Val Lys
 725 730 735

Asn Lys Glu Met Leu Ser Ile Asp Ser Asn Ser Glu Asp Ala Thr Asp
 740 745 750

Ile Ser Glu Lys Asn Gly Glu Glu Glu Leu Tyr Val Asn His Asn Ser
 755 760 765

Val Ser Val Ala Ser Gly Asn Lys Glu Ile Glu Lys Ser Lys Asp Glu
 770 775 780

Lys Gln Pro Glu Lys Glu Ala Lys Gln Thr Asn Gly Thr Leu Thr Val
785 790 795 800

Arg Thr Asp Lys Asp Ser Asp Arg Asn Lys Gly Lys Asp Thr Ala Thr
805 810 815

Asp Thr Lys Asn Ser Pro Glu Asn Leu Lys Val Gln Glu His Gly Thr
820 825 830

Asn Gly Glu Thr Ile Lys Glu Glu Pro Pro Lys Leu Pro Glu Ser Ser
835 840 845

Glu Thr Leu Gln Ser Gln Glu Gln Leu Glu Ala Glu Ala Gln Lys Gln
850 855 860

Lys Gln Glu Glu Glu Pro Lys Lys Lys Gln Glu Glu Glu Pro Lys Lys
865 870 875 880

Lys Gln Glu Glu Glu Gln Lys Arg Glu Gln Glu Gln Lys Gln Glu Gln
885 890 895

Glu Glu Glu Glu Gln Lys Gln Glu Glu Glu Gln Gln Ile Gln Asp Gln
900 905 910

Ser Gln Ser Gly Leu Asp Gln Ser Ser Lys Val Gly Val Ala Ser Glu
915 920 925

Gln Asn Glu Ile Ser Ser Gly Gln Glu Gln Asn Val Lys Ser Ser Ser
930 935 940

Pro Glu Val Val Pro Gln Glu Thr Thr Ser Glu Asn Gly Ser Ser Gln
945 950 955 960

Asp Thr Lys Ile Ser Ser Thr Glu Pro Asn Glu Asn Ser Val Val Asp
965 970 975

Arg Ala Thr Asp Ser Met Asn Leu Asp Pro Glu Lys Val His Asn Glu
980 985 990

Asn Met Ser Asp Pro Asn Thr Asn Thr Glu Pro Asp Ala Ser Leu Lys
995 1000 1005

Asp	Asp	Lys	Lys	Glu	Val	Asp	Asp	Ala	Lys	Lys	Glu	Leu	Gln	Ser
1010						1015					1020			
Thr	Val	Ser	Arg	Ile	Glu	Ser	Asn	Glu	Gln	Asp	Val	Gln	Ser	Thr
1025						1030					1035			
Pro	Pro	Glu	Asp	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Gly	Lys	Val	Gly	Asp	Lys
1040						1045					1050			
Ala	Glu	Met	Leu	Thr	Ser	Pro	His	Ala	Thr	Asp	Asn	Ser	Glu	Ser
1055						1060					1065			
Glu	Ser	Gly	Leu	Asn	Pro	Thr	Asp	Asp	Ile	Lys	Thr	Thr	Asp	Gly
1070						1075					1080			
Val	Val	Lys	Glu	Gln	Glu	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Glu	Ser	Ala	Thr
1085						1090					1095			
Glu	Thr	Ser	Lys	Ser	Asn	Leu	Glu	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Glu	Pro
1100						1105					1110			
Ser	His	Glu	Ile	Ser	Glu	Pro	Val	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Gly	Lys
1115						1120					1125			
Glu	Glu	Ser	Glu	Leu	Leu	Lys	Ser	Lys	Ser	Ile	Glu	Thr	Lys	Gly
1130						1135					1140			
Glu	Thr	Asp	Pro	Arg	Ser	Asn	Asp	Gln	Glu	Asp	Ala	Thr	Asp	Asp
1145						1150					1155			
Val	Val	Glu	Asn	Ser	Arg	Asp	Asp	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Asn	Ser
1160						1165					1170			
Val	Asp	Asn	Gln	Ser	Asn	Val	Leu	Asn	Arg	Glu	Asp	Pro	Ile	Ala
1175						1180					1185			
Ser	Glu	Thr	Glu	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Glu	Asp	Ser	Ser	Arg	Ile
1190						1195					1200			
Met	Thr	Thr	Glu	Val	Pro	Ser	Thr	Thr	Val	Lys	Pro	Pro	Asp	Glu
1205						1210					1215			
Lys	Arg	Ser	Glu	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Ile	Lys
1220						1225					1230			

Val	Glu	Pro	Val	Val	Pro	Arg	Ala	Ile	Gly	Glu	Pro	Met	Glu	Asn
1235						1240					1245			
Ser	Val	Ser	Val	Gln	Ser	Pro	Pro	Asn	Val	Glu	Asp	Val	Glu	Lys
1250						1255					1260			
Glu	Thr	Leu	Ile	Ser	Glu	Asn	Asn	Gly	Leu	His	Asn	Asp	Thr	His
1265						1270					1275			
Arg	Gly	Asn	Ile	Ser	Glu	Lys	Asp	Leu	Ile	Asp	Ile	His	Leu	Leu
1280						1285					1290			
Arg	Asn	Glu	Ala	Gly	Ser	Thr	Ile	Leu	Asp	Asp	Ser	Arg	Arg	Asn
1295						1300					1305			
Gly	Glu	Met	Thr	Glu	Gly	Ser	Glu	Ser	Asp	Val	Gly	Glu	Leu	Gln
1310						1315					1320			
Glu	His	Asn	Phe	Ser	Thr	Gln	Gln	Lys	Asp	Glu	Lys	Asp	Phe	Asp
1325						1330					1335			
Gln	Ile	Ala	Ser	Asp	Arg	Glu	Lys	Glu	Glu	Ile	Gln	Lys	Leu	Leu
1340						1345					1350			
Asn	Ile	Gly	His	Glu	Glu	Asp	Glu	Asp	Val	Leu	Lys	Met	Asp	Arg
1355						1360					1365			
Thr	Glu	Asp	Ser	Met	Ser	Asp	Gly	Val	Asn	Ser	His	Leu	Tyr	Tyr
1370						1375					1380			
Asn	Asn	Leu	Ser	Ser	Glu	Glu	Lys	Met	Glu	Gln	Tyr	Asn	Asn	Arg
1385						1390					1395			
Asp	Ala	Ser	Lys	Asp	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Asn	Arg	Ser	Asn	Thr
1400						1405					1410			
Asn	Thr	Cys	Ser	Asn	Glu	His	Ser	Leu	Lys	Tyr	Cys	Gln	Tyr	Met
1415						1420					1425			
Glu	Arg	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Glu	Thr	Cys	Ser	Glu	Asp	Lys	Arg
1430						1435					1440			

23

Leu His Leu Cys Cys Glu Ile Ser Asp Tyr Cys Leu Lys Phe Phe
 1445 1450 1455

Asn Pro Lys Ser Ile Glu Tyr Phe Asp Cys Thr Gln Lys Glu Phe
 1460 1465 1470

Asp Asp Pro Thr Tyr Asn Cys Phe Arg Lys Gln Arg Phe Thr Ser
 1475 1480 1485

Met His Tyr Ile Ala Gly Gly Gly Ile Ile Ala Leu Leu Leu Phe
 1490 1495 1500

Ile Leu Gly Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Asn Leu Asp Asp Glu Lys
 1505 1510 1515

Gly Phe Tyr Asp Ser Asn Leu Asn Asp Ser Ala Phe Glu Tyr Asn
 1520 1525 1530

Asn Asn Lys Tyr Asn Lys Leu Pro Tyr Met Val Val Asp Gln Gln
 1535 1540 1545

Ile Asn Val Val Asn Ser Asp Leu Tyr Ser Glu Gly Ile Tyr Asp
 1550 1555 1560

Asp Thr Thr Thr Phe
 1565

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> sequence is completely synthesized

<400> 13
 cctggagccc gtcagtatcg gcgg

24

<210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> sequence is completely synthesized

<400> 14
 ggtagcgacc ggcgctcagc tgg

23

<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> sequence is completely synthesized

<400> 15
aaaagtgatg atagaaatgc ttgtg

25

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> sequence is completely synthesized

<400> 16
ttttgttgat cttacttatt tcacc

25

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> sequence is completely synthesized

<400> 17
cggaatcagg tttaaatacca ac

22

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> sequence is completely synthesized

<400> 18
agatcgtttt tcatcagggg g

21

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)